

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg
Direktor: Prof. Dr. med. Frank Lammert

Risikofaktoren für spontane bakterielle Peritonitis bei Leberzirrhose

**Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2011**

vorgelegt von
Sophie Charlotte Heyer
geb. am 15.07.1986 in Idar-Oberstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Zusammenfassung – Summary	1
2. Einleitung	5
3. Patienten und Methodik	9
3.1 Patientenkollektiv	9
3.2 Sonographisch gesteuerte Aszitespunktion	9
3.3 Klinisch-chemische Parameter	10
3.4 Mikrobiologische Untersuchung von Asziteskulturen	11
3.5 Pathologische Begutachtung	12
3.6 Definition der verschiedenen Varianten einer Aszites-Infektion	12
3.7 <i>NOD2</i> -Genotypisierung	13
3.7.1 Probengewinnung	13
3.7.2 DNA-Extraktion	13
3.7.3 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	14
3.7.4 Quantitative real-time PCR (Taqman)	15
3.8 Statistische Analyse	19
3.9 Geräte und Reagenzien	21
4. Ergebnisse	22
4.1 Patientenkollektiv	22
4.2 Demographische und klinische Parameter der Subkollektive Homburg, Jena und Regensburg	24
4.2.1 Patientenkollektiv Homburg	24
4.2.2 Patientenkollektiv Jena	25
4.2.3 Patientenkollektiv Regensburg	26
4.3 Ätiologie und Konsequenzen der Leberzirrhose	26

4.4 Diagnose einer Aszites-Infektion	28
4.4.1 SBP und andere Infektionsparameter.....	28
4.4.2 CNNA und Bacteraszites	31
4.5 Hardy-Weinberg-Äquilibrium	32
4.5.1 <i>NOD2</i> -Genotypisierung	32
4.5.2 Ergebnisse nach Testung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	32
4.6 <i>NOD2</i> -Genotypisierung	37
4.6.1 <i>NOD2</i> -Mutationen und SBP	37
4.6.2 <i>NOD2</i> -Mutationen und Asziteskultur	39
5. Diskussion	44
6. Literaturverzeichnis	50

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen-presenting cell
ATG16L1	autophagy-related protein 16-1
BIR	bactulovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain
CARD	caspase activating and recruitment domain
CNNA	culture-negative neutrocytic ascites
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
IL-10	Interleukin 10
LERS	leukocyte esterase reagent stripes
LRR	leucine rich repeat
MDP	Muramyl-Dipeptid
MELD	model of end stage liver disease
MGB	minor groove binder
MHC	major histocompatibility complex
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NBS	nucleotide-binding site
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PCR	polymerase chain reaction
PRMs	pattern recognition molecules
PYD	pyrin domain
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
SBP	spontane bakterielle Peritonitis
SNP	single nucleotide polymorphism
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
U/l	Einheiten pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Zusammenfassung

Die spontane bakterielle Peritonitis (SBP) gehört zu den schweren Komplikationen einer Leberzirrhose mit Aszites. Als pathophysiologisches Erklärungsmodell dieser Infektion des Bauchraums dient das Konzept der bakteriellen Translokation. Es beschreibt den Übertritt von Bakterien enterischen Ursprungs in mesenteriale Lymphknoten, der durch eine gestörte Mukosa-Barriere ermöglicht wird. Die Mukosa-Barriere des Darms umfasst mechanische und immunologische Mechanismen. In Studien zur chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn konnte gezeigt werden, dass die immunologische Barriere bei Vorliegen bestimmter genetischer Risikofaktoren gestört ist. Drei verschiedene Varianten des *NOD2*-Gens, p.R702W, p.G908R und c.3020insC, bewirken eine verminderte Aktivierung der NF-κB Signalkaskade und begünstigen die bakterielle Translokation.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die drei oben genannten *NOD2*-Varianten auf die Entwicklung einer SBP Einfluss nehmen bzw. ihr Auftreten begünstigen. Bisher gab es zu diesem Thema nur eine Studie aus dem Jahr 2009, in der ein Zusammenhang mit der Sterblichkeit der Patienten nachgewiesen wurde.

Die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Ergebnisse belegen Assoziationen zwischen dem Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation und dem Auftreten einer SBP bzw. einer positiven Asziteskultur:

- (1) Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 157 Patienten mit Leberzirrhose und konsekutiv aufgetretenem Aszites. Bei 25 Personen (16,1%) lag eine SBP vor. Für 89 Personen des Gesamtkollektivs wurde eine Asziteskultur angelegt, die in 13 Fällen (14,6%) positiv war.
- (2) Die Hauptursache der Zirrhose war in der Mehrzahl der Fälle ein Alkoholabusus (110 Patienten, 70,1%), der signifikant häufiger bei Männern und im höheren Lebensalter dokumentiert wurde.
- (3) Zwischen dem Auftreten einer SBP und der *NOD2*-Variante c.3020insC ließ sich ein signifikanter Zusammenhang feststellen. Das Risiko für diese Komplikation war bei den Trägern von c.3020insC 4,6-fach erhöht.

- (4) Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der *NOD2*-Mutation p.R702W und dem Auftreten einer positiven Asziteskultur. Die Patienten mit p.R702W hatten ein 8,2-fach erhöhtes Risiko für eine positive Asziteskultur.
- (5) Das Vorhandensein einer der drei *NOD2*-Varianten korrelierte am stärksten mit einer positiven Asziteskultur. Die Kultur war bei Patienten mit Mutation 5,4-mal häufiger positiv als bei Patienten mit Wildtyp-Allelen.
- (6) Unabhängig von den *NOD2*-Varianten fiel ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines CNNA (= culture-negative neutrocytic ascites) und der Höhe der Bilirubin-Konzentration auf. Bei Patienten mit CNNA war sie signifikant erhöht.

Unsere Studie untermauert somit die Hypothese, dass die drei *NOD2*-Varianten eine Rolle für die Ätiologie der SBP spielen. Die funktionellen Mechanismen, die dieser Assoziation zugrunde liegen, müssen allerdings noch durch weitere Untersuchungen eruiert werden.

Summary

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is part of the serious complications that can occur in patients with liver cirrhosis and ascites. The concept of bacterial translocation is used as a pathophysiological explanatory model of this abdominal infection. It describes the migration of intestinal bacteria to mesenteric lymph nodes, enabled by a dysfunction in the mucosa barrier. The intestinal mucosa barrier is based on mechanic and immunologic mechanisms. Studies in patients with Crohn's disease, a chronic inflammatory bowel disease, have shown that the immunologic system is disturbed if certain genetic risk factors are present. In this context, three different variants of the *NOD2* gene, p.R702W, p.G908R and c.3020insC, have been associated with decreased activation of the NF- κ B signaling pathway and bacterial translocation.

In the present study, we have assessed whether the three *NOD2* variants influence the development of SBP. Until now, a single study has reported an association with the mortality of cirrhotic patients in 2009.

The results of this study prove associations between the presence of a *NOD2* mutation and the appearance of SBP, respectively a positive ascites culture:

- (1) The cohort included 157 patients with liver cirrhosis and ascites. Overall, 25 persons (16.1%) were diagnosed with SBP. An ascites culture was obtained in 89 patients, and 13 cultures (14.6%) were tested positive.
- (2) The main cause of cirrhosis was alcohol abuse (110 patients, 70.1%) that was documented significantly more often in men and at higher age.
- (3) There was a significant association between the appearance of SBP and the *NOD2* variant c.3020insC. The risk for this complication was 4.6-fold higher in carriers of c.3020insC.
- (4) A significant association could also be observed between the presence of the *NOD2* mutation p.R702W and the appearance of a positive ascites culture. Patients with p.R702W had an 8.2-fold higher risk for a positive ascites culture.

- (5) The presence of one of the three *NOD2* variants correlated most strongly with a positive ascites culture. In patients carrying a mutation, a positive culture was shown 5.4 times more often than in carriers of wild-type alleles.
- (6) Independent of the *NOD2* variants, we noticed a significant correlation between the presence of CNNA (= culture-negative neutrocytic ascites) and serum bilirubin concentrations, which were significantly increased in patients with CNNA.

In conclusion, our study supports the hypothesis that the three *NOD2* variants play a role in the etiology of SBP. However, the functional mechanisms that underlie this association have to be defined by further studies.

2. Einleitung

Spontane bakterielle Peritonitis – Pathophysiologie und Klinik

Die spontane bakterielle Peritonitis (SBP) ist definiert als Infektion eines Aszites ohne Vorliegen einer intestinalen Läsion. Sie ist eine häufige Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und tritt mit einer Inzidenz zwischen 10 und 50 % pro Jahr auf [1]. Das Konzept dieser „spontan auftretenden“ Infektion wurde 1964 in den Vereinigten Staaten von Harold Conn etabliert. Damit stieß er zunächst allerdings auf wenig Akzeptanz, war man doch zuvor davon ausgegangen, dass die spontane Entstehung dieser Entzündung nicht möglich ist. Es stellte sich die Frage, wie pathogene Keime in einen intakten Bauchraum gelangen sollten, um dort die freie Flüssigkeit zu besiedeln und eine Entzündung auszulösen [2]. Als pathophysiologische Ursache wurde inzwischen experimentell belegt [3], dass Bakterien enterischen Ursprungs die Mukosa-Barriere des Darms überwinden – dieser Prozess wird *bakterielle Translokation* genannt – mesenteriale Lymphknoten befallen und von dort in die systemische Zirkulation und andere Organe gelangen.

Bei der SBP handelt es sich meist um eine monomikrobielle Infektion, die überwiegend durch gramnegative Keime der Darmflora (vor allem *E. coli*), seltener durch grampositive Bakterien oder Pilze, verursacht wird [1]. Die Wahrscheinlichkeit für einen Zirrhose-Patienten mit Aszites, innerhalb eines Jahres diese Komplikation zu erleiden, liegt bei bis zu 50%. Die Inzidenz variiert in unterschiedlichen Studien [1, 4]. Über 70% der Fälle treten bei Zirrhotikern im Stadium Child C auf [5]. Das klinische Erscheinungsbild der SBP ist sehr variabel und hängt u.a. davon ab, wann die Infektion diagnostiziert wird. So sind beispielsweise das Auftreten einer hepatischen Enzephalopathie, Übelkeit und Erbrechen sowie Durchfall möglich [6]. Etwa 13 % der Patienten zeigen einen asymptomatischen Verlauf [7]. Abdominelle Schmerzen können in unterschiedlicher Ausprägung auftreten [8]. Zeichen einer schweren abdominalen Infektion mit Fieber und Schock werden im Zusammenhang mit einer SBP seit einigen Jahren seltener beschrieben, was mit dem verbesserten Kenntnisstand und der frühen Durchführung diagnostischer Parazentesen zusammenhängen könnte [8].

Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer SBP gelten unter anderem der Schweregrad der vorliegenden Leberzirrhose, eine gastrointestinale Blutung [9], ein Eiweißgehalt des Aszites $< 1,0 - 1,5 \text{ g/dl}$ [10], ein Bilirubin-Wert $> 3,2 \text{ mg/dl}$ und eine Thrombozytenzahl < 98.000 [11]. Da Patienten mit Leberzirrhose meist eine milde Hypothermie aufweisen, ist jeder Temperaturanstieg $> 37,8 \text{ °C}$ verdächtig [8].

Das eher diffuse Krankheitsbild macht eine klare, standardisierte Diagnostik erforderlich. Dafür ist eine diagnostische Parazentese unumgänglich, die eine geringe Komplikationsrate hat. Als häufigster unerwünschter Nebeneffekt kann ein länger bestehendes Aszites-Leck in der Bauchdecke auftreten [8]. Anhaltende Blutungen nach dem Eingriff sind sehr selten [12-15]. Als Goldstandard zur SBP-Diagnostik gilt der Nachweis von mehr als 250 neutrophilen Granulozyten pro μl Aszitespunktat und/oder der mikrobiologische Keimnachweis [1]. Dabei hat sich in mehreren Studien die unmittelbar am Patientenbett erfolgende Beimpfung von Blutkulturflaschen (aerob und anaerob) mit Aszites als überlegen gezeigt. Deren Einsatz kann die Ausbeute der Aszites-Kulturen von 40% auf über 80% steigern [16]. Der Nachweis der Granulozytenzahl kann manuell unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer oder automatisch erfolgen. Beide Verfahren sind als gleich effektiv anzusehen [17, 18]. Als klinisch-chemische Parameter sollten die Konzentrationen von Gesamt-Protein, Albumin, Glucose und Lactatdehydrogenase in jeder Aszites-Probe bestimmt werden [8].

Nach Diagnose einer SBP – aber auch bei Verdacht – ist unverzüglich eine antibiotische Therapie einzuleiten, auf das Ergebnis der Blutkulturen kann nicht gewartet werden. Cephalosporine der dritten Generation, z.B. Cefotaxim, sind hier das Mittel der Wahl, weil sie (1) relativ sicher sind und gut toleriert werden, (2) ein breites Aktivitätsspektrum besitzen und sich (3) als sehr effektiv in der Behandlung der SBP erwiesen haben [8, 19, 20]. Der Internationale Aszites Club empfiehlt 48 Stunden nach Beginn der Therapie eine zweite Parazentese, um die Wirkung des Medikaments zu kontrollieren und gegebenenfalls ein anderes Antibiotikum zu verordnen [21, 22].

Trotz früher Diagnostik und verbesserter Therapie ist die Langzeit-Prognose von Zirrhose-Patienten mit einer SBP-Episode in der Vorgeschichte schlecht. Die 1-Jahres-Rezidivrate liegt bei etwa 70% [23]. Die mittlere Überlebenszeit von Patienten, die eine SBP entwickeln, beträgt ungefähr neun Monate [24]. Studien weisen darauf hin, dass die Rezidivrate und das Risiko für Patienten mit Zirrhose und zusätzlicher gastrointestinaler Blutung durch die Einnahme von Norfloxacin (400 mg/Tag) oder Ciprofloxacin (500 mg/Tag) gesenkt werden kann [25-30]. Die aktuellen EASL-Guidelines (EASL = European Association for the Study of the Liver) von 2010 befürworten die Einnahme einer antibiotischen Prophylaxe bei den folgenden beiden Risikogruppen: Patienten mit akuter gastrointestinaler Blutung und Patienten mit SBP-Episode in der Anamnese. Im Falle eines Blutungsgeschehens und gleichzeitiger schwerer Lebererkrankung wird eine i.v.-Antibiose mit Ceftriaxon empfohlen. Ist der Leberschaden weniger stark ausgeprägt, so kann oral mit Norfloxacin oder einem Chinolon behandelt werden. Bei Patienten mit Zustand nach SBP reduziert eine orale Antibiose mit 400 mg Norfloxacin/Tag das Rezidivrisiko.

Immunologische Abwehrmechanismen und die Rolle von NOD2

Das Intestinum bildet ein Reservoir für Bakterien und bakterielle Produkte wie Endo- und Exotoxine oder Zellwandfragmente. Unter bestimmten Voraussetzungen können sie die Darmwand überwinden und in mesenteriale Lymphknoten und die Blutbahn gelangen. Um dies zu verhindern, gibt es die Mukosa-Barriere des Darms, die aus zwei Komponenten besteht: einerseits aus einer mechanischen Barriere, gebildet von den Epithelzellen der Mukosa und abgedichtet durch eine Reihe von Adhäsionsverbindungen sowie tight junctions, die eine Diffusionsbarriere schaffen, und andererseits aus der Kombination von angeborener und erworbener Immunabwehr. Veränderungen in einem oder beiden Systemen erhöhen die Durchlässigkeit der Mukosa und werden für die bakterielle Translokation verantwortlich gemacht [31]. Die vorliegende Arbeit fokussiert mit der Analyse des *NOD2*-Gens auf den immunologischen Teil der Mukosa-Barriere.

NOD2 (NOD steht für nucleotide-binding oligomerization domain) codiert für das NOD2-Protein, das man zur Gruppe der so genannten NBS-LRR-Proteine (= nucleotide-binding site and leucine rich repeat) zählt. Diese sind intrazellulär aktiv und bilden eine Untergruppe der „pattern recognition molecules“ (PRMs). Die PRMs können mikrobielle Komponenten sowohl im Extra- als auch im Intrazellularraum erkennen und werden von den intestinalen Epithelzellen exprimiert. Die Familie der NBS-LRR-Proteine gehört zur angeborenen Immunabwehr und zeichnet sich durch drei strukturelle Domänen aus:

1. C-terminal ein LRR-Abschnitt, der mikrobielle Bestandteile erkennen kann,
2. intermediär ein NBS-Anteil, der die Oligomerisierung von NBS-LRR-Proteinen vermittelt sowie
3. N-terminal verschiedene Effektor-Anteile, wie z.B. PYD (pyrin domain), CARD (caspase-activating and recruitment domain) oder BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain).

Durch den N-terminalen Anteil, also die unterschiedlichen strukturellen Domänen PYD, CARD oder BIR, lassen sich verschiedene Subfamilien unterteilen. NOD-Proteine wie NOD2 enthalten CARD-Domänen [35]. Das NOD2-Protein reguliert proinflammatorische Signalwege. Es kann einen spezifischen Peptidoglykan-Anteil von Bakterien, Muramyl-Dipeptid (MDP), erkennen. Als Reaktion auf die Detektion dieses Markers wird ein spezifischer Transkriptionsfaktor, NF- κ B, mit Hilfe der N-terminalen CARD-Domäne aktiviert [32]. NF- κ B steigert im Sinne eines proinflammatorischen Mediators die Transkription vieler Zytokine und Adhäsionsmoleküle (z.B. Integrine und Selektine).

Das für NOD2 codierende Gen ist auch unter dem Namen *CARD15* (caspase-recruiting domain protein 15) bekannt und auf dem Chromosom 16 lokalisiert. Es wurde 2001 durch Studien zur chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn bekannt. Drei genetische Varianten von *NOD2* konnten unabhängig voneinander mit der Prädisposition für diese Erkrankung assoziiert werden [33, 34]. Auch in Abstoßungsreaktionen nach Transplantation sind sie involviert [35, 36]. Bei den drei Varianten handelt es sich um die Mutationen p.R702W, p.G908R und c.3020insC. Sie können die normalerweise vom NOD2-Protein gesteuerten Signalwege beeinflussen, indem sie für ein verändertes und möglicherweise fehlerhaftes Protein codieren. Die c.3020insC-Mutation führt beispielsweise zu einem NOD2-Protein mit fehlender LRR-Domäne [32]. Wird dieser Anteil von NOD2 zerstört, so wird das Protein unempfindlich gegenüber MDP, was als Konsequenz zu einer veränderten Immunabwehr führt [37]. Insgesamt ist bei verändertem NOD2-Protein eine mehr oder minder eingeschränkte NF- κ B-Aktivierung festzustellen. Daraus können autoinflammatorische Fehlsteuerungen resultieren [32]. Eine insuffiziente Aktivierung von NF- κ B könnte möglicherweise sowohl die unzureichende Vernichtung translozierter Bakterien bewirken, als auch die bakterielle Translokation per se steigern. Ob Defekte von NOD2 auch für eine erhöhte bakterielle Translokation bei Patienten mit Leberzirrhose prädisponieren, ist bisher unklar.

Ziel der Arbeit

Die genauen molekularen Mechanismen, welche die bakterielle Translokation als pathophysiologische Grundlage der SBP erst möglich machen, konnten bisher nur unvollständig identifiziert werden. Auch ist unklar, ob eine genetische Prädisposition für die Entstehung einer SBP existiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen den drei Varianten p.R702W, p.G908R und c.3020insC des *NOD2*-Gens und dem Auftreten einer SBP als Zirrhose-Komplikation aufzuzeigen. Dazu wurden ein Patientenkollektiv für diese drei Mutationen genotypisiert und das Auftreten einer SBP registriert. Die Arbeit sollte klären, ob spezifische Veränderungen im *NOD2*-Gen im Sinne einer genetischen Prädisposition die bakterielle Translokation und damit die SBP-Genese begünstigen.

3. Patienten und Methodik

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste Patienten mit (sonographisch / bioptisch) nachgewiesener Leberzirrhose und Aszites, die im Universitätsklinikum des Saarlandes (n = 25), im Universitätsklinikum Jena (n = 27) und im Universitätsklinikum Regensburg (n = 105) stationär behandelt wurden. Zu den Einschlusskriterien zählte (1) das Vorhandensein einer Leberzirrhose gemäß histologischen, bildgebenden, klinischen oder analytischen Zeichen, (2) der Nachweis von Aszites, der einer diagnostischen Parazentese zugänglich ist, und (3) der Nachweis einer spontanen bakteriellen Peritonitis, definiert durch eine Neutrophilen-Konzentration im Aszites $\geq 250/\mu\text{l}$. Die Aszitesbildung musste auf den Leberschaden zurückzuführen sein und nicht auf andere Prozesse, wie beispielsweise einen prähepatischen Block, eine sekundäre Peritonitis, eine tuberkulöse Peritonitis, eine akute Pankreatitis oder eine gesicherte Peritonealcarcinose bei Malignom, die Ausschlusskriterien darstellten. Jede Person wurde vor der Probenentnahme über die Studie, ihren Sinn und Zweck und die Konsequenzen für den Probanden informiert und unterzeichnete eine Einverständniserklärung. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen der multizentrischen ACTION-Studie zur prognostischen und diagnostischen Relevanz des Nachweises bakterieller DNA bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites.

3.2 Sonographisch gesteuerte Aszitespunktion

Im Rahmen der SBP-Diagnostik und zur Abklärung einer eventuellen bakteriellen Besiedlung der Aszites-Flüssigkeit wurden bei den Patienten nach Möglichkeit Parazentesen durchgeführt. Zunächst wurde mittels Sonographie die Aszitesmenge beurteilt und die günstigste Punktionsstelle ausgewählt. Nach Markierung derselben erfolgten eine Lokalanästhesie mit Xylocain und danach die Nadel-Punktion. Der abgelassene Aszites wurde in entsprechende Röhrchen und Spritzen gefüllt und unmittelbar danach in die Laboratorien verbracht.

3.3 Klinisch-chemische Parameter

Klinisch-chemische Parameter wurden von sämtlichen Patienten während des stationären Aufenthalts erhoben. Sie ermöglichten unter anderem die Beurteilung des Schweregrades der Lebererkrankung und eine SBP-Diagnostik. Alle Parameter wurden in den Zentrallaboratorien der Universitätskliniken Homburg, Jena bzw. Regensburg bestimmt und in eine SPSS-Wertetabelle eingetragen. Die für das jeweilige Material benötigten Parameter sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 1: Blut-Parameter.

Parameter	Einheit
Quick	%
INR	ohne
Eiweiß	g/l
Albumin	g/l
Bilirubin (gesamt)	mg/dl
Kreatinin	mg/dl
CRP	mg/l

Aus den oben stehenden Blutwerten (Tabelle 1) wurden für jeden Patienten der MELD (= **M**odel of **E**nd Stage **L**iver **D**isease)- bzw. der Child-Pugh-Score bestimmt (Tabelle 2). Der MELD-Score errechnet sich auf der Basis dreier Parameter: dem Serum-Kreatinin [mg/dl], dem Gesamt-Bilirubin [mg/dl] und dem INR (international normalized ratio).

Für die Berechnung nach der Formel gelten außerdem folgende Regeln:

- Der kleinste Wert für alle Variablen ist 1.
- Serum-Kreatinin-Werte werden auf einen Maximalwert von 4 mg/dl begrenzt.
- Der MELD-Score endet mit einem Wert von maximal 40 Punkten.

Die Formel lautet

MELD-Score =

$$10 (0,957 \ln(\text{Kreatinin}[\text{mg/dl}]) + 0,378 \ln(\text{Gesamtbilirubin}[\text{mg/dl}]) + 1,12 \ln(\text{INR}) + 0,643)$$

Tabelle 2: Child-Pugh-Score.

Kriterium	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	Einheit	5 – 6 Punkte: Child A 7 – 9 Punkte: Child B 10 – 15 Punkte: Child C
Serum-Bilirubin _(gesamt)	< 2,0	2,0 - 3,0	> 3,0	mg/dl	
Serum-Albumin	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8	g/dl	
INR	< 1,7	1,7 - 2,2	> 2,2	ohne	
Aszites im Ultraschall	keiner	leicht	mittelgradig	ohne	
hepatische Enzephalopathie	keine	Stadium I-II	Stadium III-IV	ohne	

Tabelle 3: Aszites-Parameter.

Parameter	Einheit
Leukozyten	$10^9/l$
Erythrozyten	$10^{12}/l$
Neutrophile	%
Lymphozyten	%
Eiweiß	g/l
Albumin	g/l
Glukose	mg/dl
LDH	U/l
Lactat	mmol/l

3.4 Mikrobiologische Untersuchung von Asziteskulturen

Um eine bakterielle Besiedelung der Aszitesflüssigkeit als Zeichen einer stattgefundenen bakteriellen Translokation zu erkennen, wurden Asziteskulturen angelegt. Der native (= unverdünnte) Aszites wurde zunächst mikroskopisch auf sichtbare Bakterien untersucht (Keimzahl in diesem Fall $> 10^5$ /ml) und anschließend in Flüssigbouillon eine Kultur angelegt. Das Punktat wurde hierzu sowohl in speziellen aeroben (Tryptic Soy Broth = tryptisch verdauter Sojabohnenbrühe) als auch in anaeroben Flüssignährboden (Thioglykolat Bouillon nach Brewer) überführt und bei 35°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre für sieben Tage bebrütet. In einigen Fällen wurden zusätzlich zur Nativprobe jeweils eine aerobe und eine anaerobe Blutkulturflasche mit Aszites beimpft. In Blutkulturflaschen eingesandter Aszites wurde ebenfalls für sieben Tage bei 35°C bebrütet. Zur Identifizierung der möglicherweise im Aszites

enthaltenen Bakterien und der Durchführung eines Antibiotogramms wurde eine Agar-Kultur angelegt. Im Falle des nativen Aszites wurde direkt eine Agar-Platte beimpft, bei den Blutkulturflaschen erfolgte eine Plattung der trüb gewordenen (= bewachsenen) Bouillon. Blieb der Agar sieben Tage unbewachsen und die Bouillon klar, war das Material als „negativ“ anzusehen.

3.5 Pathologische Begutachtung

Das Aszitespunktat wurde zytopathologisch in den Instituten für Pathologie der beteiligten Universitätskliniken auf maligne Zellen untersucht. Auf diese Weise konnten die Abgrenzung zu malignem Aszites erfolgen und eine mögliche Entzündungsaktivität festgestellt werden.

3.6. Definition der verschiedenen Varianten einer Aszites-Infektion

Mittels der Ergebnisse von Kultur und pathologischer Untersuchung konnten drei verschiedene Formen der Aszites-Infektion unterschieden werden: SBP, Bacteraszites und CNNA.

Die *SBP* ist definiert als das Vorliegen einer positiven Asziteskultur und einer Neutrophilenzahl von mehr als 250/ μ l in Abwesenheit einer intraabdominalen Infektion [1]. Liegt die Zahl der neutrophilen Granulozyten bei weniger als 250/ μ l und ist die Kultur dennoch positiv, spricht man von einem *Bacteraszites* [38]. Bei negativer Asziteskultur und einer Neutrophilenzahl \geq 250/ μ l liegt ein so genannter *CNNA* (= culture-negative neutrocytic ascites) vor [6]. Im Falle dieser Diagnose wurden andere Gründe für einen neutrophilen Aszites wie vorherige Antibiose, peritoneale Karzinose etc. ausgeschlossen [39].

Für die Bestimmung aller drei Infektionsformen galt, dass bei fehlenden Werten für die Neutrophilenzahl auf die Zahl der Leukozyten zurückgegriffen wurde. Hier war ein Wert \geq oder $<$ 500 Leukozyten/ μ l Aszites das ausschlaggebende Kriterium für die Diagnose bzw. den Ausschluss einer SBP.

3.7 *NOD2*-Genotypisierung

3.7.1 Probengewinnung

Den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden Blut- und Aszitesproben entnommen, zwecks weiterführender Diagnostik und DNA-Isolierung aus dem Blut. Für die DNA-Isolierung wurden jeweils zwei EDTA-Röhrchen und zwei Serum-Röhrchen Blut abgenommen. Die Serum-Röhrchen wurden im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II zentrifugiert und der Überstand bei -70°C gelagert. Aus dem EDTA-Blut (Vollblut) erfolgte eine DNA-Isolierung, um anschließend die drei Mutationen p.R702W, p.G908R und c.3020insC des *NOD2*-Gens zu bestimmen. Zusätzlich zu den Blutproben wurden bei der Punktion von jedem Patienten zwei Serumröhrchen mit Aszites entnommen, um klinisch-chemische Parameter zu bestimmen. Der Aszites wurde bei -70°C gelagert.

Bei den Patienten wurden die für die Entwicklung der Zirrhose auslösende Grunderkrankung sowie der Schweregrad der Zirrhose dokumentiert. Andere Ursachen für die Aszitesbildung wurden anamnestisch und diagnostisch ausgeschlossen.

3.7.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus dem Vollblut erfolgte nach dem Spin Protokoll aus dem QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook.

Zunächst wurden 20 µl QIAGEN Protease auf den Boden eines 1,5 ml-Mikrozentrifugen-Röhrchens gegeben. Dazu wurden 200 µl der jeweiligen Blutprobe pipettiert, gefolgt von 200 µl Puffer AL. Der Ansatz wurde für 15 Sekunden mittels pulse-vortexing vermischt. Bei 56°C wurde der Ansatz für 10 min inkubiert, und danach die Mikro-Zentrifugenröhrchen kurz zentrifugiert, um Tröpfchen im Deckel zu entfernen. Nachfolgend wurden 200 µl Ethanol (96 - 100%) hinzugefügt, der Ansatz wieder durch pulse-vortexing für 15 Sekunden vermischt und wie oben kurz zentrifugiert. Die Mixtur wurde nun vorsichtig in QIAamp Mini Zentrifugenröhrchen (2 ml) gefüllt und bei 8.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Dann wurden die Zentrifugenröhrchen in neuen 2 ml-Probenbehältern platziert. Es wurden jeweils 500 µl Puffer AW1 zugegeben und die Zusätze bei 8.000 U/min 1 min zentrifugiert. Wie zuvor wurden neue 2 ml-Probenbehälter verwendet. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl Puffer AW2 und es wurde bei 14.000 U/min für 3 min zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden in frischen 2 ml-Probenbehälter platziert und bei 14.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Zentrifugenröhrchen in neuen 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen platziert. 200 µl Puffer AE oder destilliertes Wasser wurden hinzugefügt, der Ansatz bei Raumtemperatur (15 - 20°C) 1 min inkubiert und dann für 1 min bei 8.000 U/min zentrifugiert.

3.7.3 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Patienten-DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektralphotometers und der zugehörigen Software durchgeführt. Das Gerät zerlegt das Spektrum des sichtbaren Lichts in eine Anzahl schmaler Bänder und misst die Absorption durch die Probe bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Nulllinie bildet der Absorptionswert der Probe bei 340 nm. Die Konzentration einer DNA-Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm mit 10 mm Bandbreite gemessen (Abbildung 1). Aus der Extinktion (E) der Lösung kann die exakte DNA-Konzentration anhand des folgenden Verhältnisses berechnet werden:

$$E_{260} = 1 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

Für die Bestimmung der DNA-Reinheit wird bei drei Wellenlängen (230, 260 und 280 nm) die Absorption gemessen. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm. Das Verhältnis der Nukleinsäuren-Absorption (260 nm) zur Protein-Absorption (280 nm) gibt daher Auskunft über eine mögliche Kontamination mit Proteinen. Ein Verhältnis von $\sim 1,8$ spricht für eine reine DNA-Isolierung. Ein Wert $< 1,8$ kann auf eine Verunreinigung mit Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten hinweisen, die bei 280 nm stark absorbieren. Außer dem Verhältnis 260/280 kann noch das Verhältnis 260/230 bestimmt werden. Dieses liegt normalerweise im Bereich von 1,8 - 2,2 und ist ein Indikator für weitere Verunreinigungen.

Für die Durchführung der Messungen mit dem NanoDrop wurde die asservierte, eingefrorene Patienten-DNA aufgetaut und mittels pulse-vortexing kurz durchmischt. Der NanoDrop wurde mittels einer Wasserprobe initialisiert und dann zunächst als Leerwert eine Probe des AE-Puffers (Bestandteil des QIAamp DNA Mini Kit, siehe Abschnitt 3.7.2) registriert. Nun wurden jeweils 1,1 μl einer Patienten-Probe auf die Messfläche des Spektralphotometers pipettiert und die Messung gestartet.

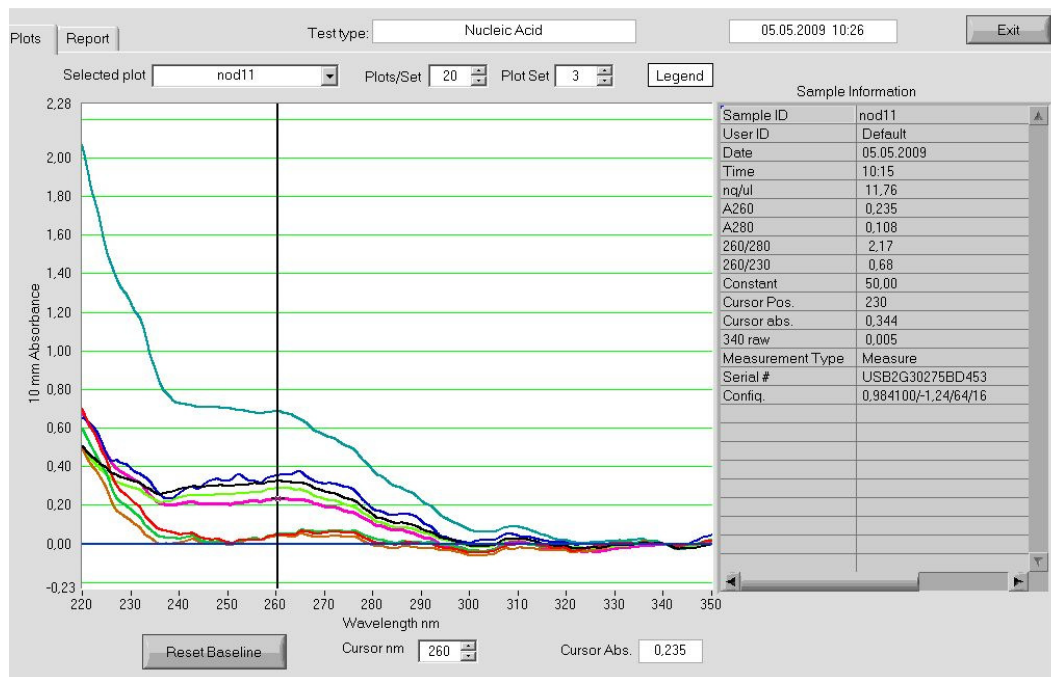


Abb. 1: Messung der Extinktion verschiedener DNA-Proben bei 260 nm. Ausschnitt aus der Bildschirmansicht der Software des NanoDrop. Auf der x-Achse sind die Wellenlänge λ [nm] und auf der y-Achse die Absorption bei 10 mm Bandbreite aufgetragen. Die vertikale Linie bei 260 nm zeigt die Absorption der einzelnen DNA-Proben bei dieser Wellenlänge. Links sind verschiedene Kurven, die einzelnen DNA-Proben entsprechen, dargestellt. Rechts können die Messdaten aus einer Tabelle abgelesen werden (Bildquelle: Firmensoftware des NanoDrop ND-1000).

3.7.4 Quantitative real-time PCR (Taqman)

Um die genetische Diagnostik durchführen zu können, wurde die aus dem Blut isolierte DNA zunächst vervielfältigt. Die quantitative real-time PCR (= polymerase chain reaction) ist eine vollautomatische Methode, mit der man DNA-Abschnitte in vitro schnell und effektiv amplifizieren kann (Verfahren der normalen PCR), die aber gleichzeitig auch die Quantifizierung der vervielfältigten DNA ermöglicht.

Die Quantifizierung erfolgt während eines PCR-Zyklus mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen. Bei der quantitativen real-time PCR werden hochspezifische Sonden für die zu amplifizierende DNA verwendet. Jede Sonde wird an ihren Enden markiert, und zwar am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (hier: VIC; oder FAM = 6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (hier: TAMRA = 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin). Außerdem befindet sich am 3'-Ende ein so genannter „minor groove binder“ (MGB), der die Schmelztemperatur der Proben erhöht. Dadurch ist es möglich, kürzere Sonden zu designen, wodurch sich die Spezifität der Messung verbessert. Durch die räumliche Nähe zwischen Quencher- und Reporter-Farbstoff kann der so genannte Quencher ein Fluoreszenzsignal unterdrücken, indem der energetisch höhere Reporter seine Energie auf den

energetisch niedrigeren Quencher überträgt. Man nennt diesen Vorgang FRET (= Fluorescence Resonance Energy Transfer). Wenn die Taq-Polymerase, die eine zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, im Rahmen der PCR die Sonde zwecks Synthetisierung des Gegenstrangs abbaut, entfernen sich Reporter-Farbstoff und Quencher voneinander. Dieser Vorgang löst ein mit der Entfernung zunehmendes Fluoreszenzsignal aus. Die Messung des Signals findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt, wobei die Stärke der Fluoreszenz aufgrund der Akkumulation des PCR-Produkts mit jedem Zyklus ansteigt (Abbildung 2).

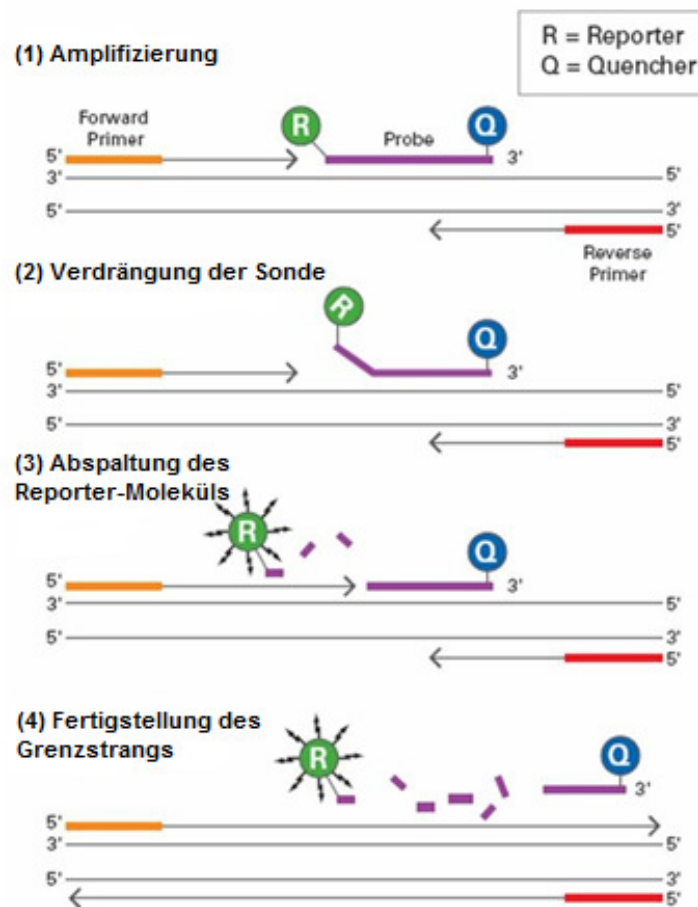


Abb. 2: Funktionsweise der qRT-PCR mit dem Taqman.

Der erste Schritt (1) stellt die Amplifizierung der DNA-Probe dar. An den Einzelstrang ist eine der hochspezifischen Sonden angelagert, die für diesen Vorgang verwendet werden. Am 3'-Ende ist sie mit dem Quencher-Farbstoff (Q), am 5'-Ende mit dem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (R) markiert. Das Fluoreszenzsignal wird durch die räumliche Nähe der beiden Moleküle unterdrückt. Im zweiten bis vierten Schritt wird die Sonde durch die Taq-Polymerase, die den Gegenstrang synthetisiert, zunächst verdrängt (2) und dann abgebaut. Dabei wird das Reporter-Molekül abgespalten und durch die räumliche Entfernung zum Quencher ein Fluoreszenzsignal ausgelöst (3). Die Fertigstellung des Grenzstrangs (4) ermöglicht dann die Quantifizierung der amplifizierten DNA (Bildquelle: http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx).

Zur Auswertung des Taqman-Assays wurde das Verfahren der Endpunkt-Bestimmung zur allelischen Diskriminierung verwendet. Die allelische Diskriminierung ist eine Methode, mit welcher der Taqman das Vorliegen von „single nucleotide polymorphisms (SNPs)“ in der Patienten-DNA erkennen kann. SNP bedeutet, dass in der Sequenz der c-DNA ein Nukleotid ausgetauscht wird. Dieser Austausch kann dazu führen, dass plötzlich für eine andere Aminosäure codiert wird als zuvor. Je nachdem, welche Aminosäure eingebaut wird, kann die Funktion des entstehenden Proteins beeinträchtigt oder der Leserahmen verschoben werden. Für die vorliegende Studie wurde die aus dem Vollblut extrahierte DNA auf die drei Mutationen p.R702W (Ex3 c.2023C/T, rs2066844), p.G908R (Ex7 c.2641C/G, rs2066845) und c.3020insC (c.3016_3017insC, rs2066847) im *NOD2*-Gen untersucht. Bei der Variante p.R702W wird die Base Cytosin an Position 2023 der c-DNA gegen die Base Thymin getauscht. Daraus resultiert, dass im Protein an Position 702 statt der Aminosäure Arginin (R) die Aminosäure Tryptophan (W) eingefügt wird. Bei der Mutation p.G908R wird Cytosin an Stelle 2641 der c-DNA durch die Base Guanin ersetzt, wodurch im Protein die Aminosäure Glycin (G) in Position 908 gegen Arginin (R) ausgetauscht wird. Im Fall der Variante c.3016_3017insC schließlich wird zwischen den Positionen 3016 und 3017 der c-DNA ein zusätzliches Nukleotid mit der Nukleobase Cytosin eingebaut, wodurch sich die Aminosäuren-Sequenz des Proteins verschiebt.

Um das mögliche Vorliegen dieser Mutationen in der Patienten-DNA zu bestimmen, wurden drei Ansatz-Reihen (je ein Ansatz pro SNP) in die Vertiefungen einer 96 PCR Platte pipettiert. Am Ende jeder Ansatz-Reihe befanden sich drei Kontrollen mit humanen Vergleichsproben und drei Negativ-Kontrollen mit Wasser. Zunächst wurden 18 µl des PCR-Grundansatzes (Mastermix Invitrogen + Referenz ROX + spezifische Sonden [an den Enden markiert mit VIC oder FAM und MGB] + Forward (F)- oder Reverse (R)-Primer + Aqua bidest.) in die Vertiefungen gegeben. Bei ROX (= 6-Carboxy-X-Rhodamin) handelt es sich um einen passiven Referenzfarbstoff, mit dessen Hilfe störende Fluktuationen der Fluoreszenz ausgeglichen werden. Im zweiten Schritt erfolgte entweder die Zugabe von 2 µl zu prüfender Patienten-DNA, humaner Vergleichs-DNA (Kontrollen) oder Wasser (Negativ-Kontrollen). Anschließend wurde die Platte mit einem MicroAmp Optical Adhesive Film abgedeckt und in das Taqman-Gerät eingebracht.

Die Sonden und Primer sind für die zu prüfenden Allele hochspezifisch und wurden mit dem Programm „Primer Express“ von Applied Biosystems erstellt. In der vorliegenden Arbeit steht Allel 1 immer für das mutierte Allel und Allel 2 für das Wildtyp-Allel. Die Sonde für Allel 1 wurde stets mit dem Reporter-Farbstoff VIC, die für Allel 2 mit dem Reporter-Farbstoff FAM markiert. Lag bei einem Patienten ein mutiertes Allel vor, so konnte die VIC-markierte Sonde binden, die FAM-markierte nicht. Umgekehrtes galt für das Wildtyp-Allel. Daraus ergibt sich,

dass der Taqman bei der allelischen Diskriminierung anhand der Fluoreszenzsignale (VIC oder FAM) zwischen Mutation (SNP) und Wildtyp unterscheiden kann (Abbildungen 3 und 4).

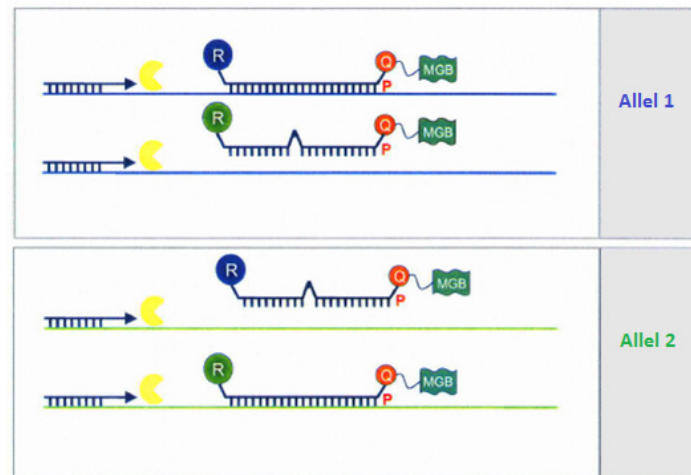


Abb. 3: Spezifität der Sonden für ein bestimmtes Allel. Dargestellt sind zwei verschiedene Allele. Allel 1 entspricht der Mutation und Allel 2 dem genetischen Wildtyp. Für jedes Allel gibt es nur eine spezifische Sonde, die jeweils mit einem bestimmten Reporter-Farbstoff (VIC oder FAM) markiert ist. Die VIC-Sonde (hier blau markiert) bindet nur an Allel 1, die FAM-Sonde (hier grün markiert) erkennt nur Allel 2 (Bildquelle: Applied Biosystems).

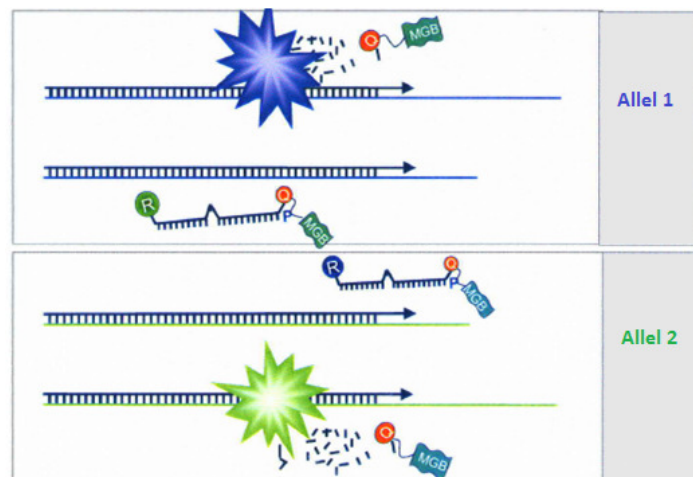


Abb. 4: Prinzip der allelischen Diskriminierung. Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Allele. Allel 1 entspricht dem mutierten Allel und Allel 2 dem Wildtyp-Allel. Die Sonden sind für ein Allel spezifisch. Je nachdem, welche Sonde (VIC- oder FAM-markiert) bindet, ergibt sich ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal (hier: blau für VIC und grün für FAM). Dadurch kann erfasst werden, ob der Wildtyp oder eine Mutation vorliegen. Siehe dazu weitere Erläuterungen im Text (Bildquelle: Applied Biosystems).

Die verwendeten Sonden hatten folgende Sequenzen:

Mutation p.R702W

Sonde VIC (Allel 1): 5' – CCTGCTCTGGCGCC – 3'

Sonde FAM (Allel 2): 5' – CTGCTCCGGCGCC – 3'

Mutation p.G908R

Sonde VIC (Allel 1): 5' – ACTCTGTTGCGCCAGA – 3'

Sonde FAM (Allel 2): 5' – CTGTTGCCCCAGAAT – 3'

Mutation c.3020insC

Sonde VIC (Allel 1): 5' – TGCAGGCCCCCTTG – 3'

Sonde FAM (Allel 2): 5' – CTGCAGGCCCTTG – 3'

Zur Amplifizierung der DNA wurden nachstehende Primer verwendet:

Mutation p.R702W

Primer F: 5' – CTGAGTGCCAGACATCTGAGAAG – 3'

Primer R: 5' – GCTGCGGGCCAGACA – 3'

Mutation p.G908R

Primer F: 5' – TGATCACCCAAGGCTTCAGC – 3'

Primer R: 5' – GAACACATATCAGGTACTCACTGACAC – 3'

Mutation c.3020insC

Primer F: 5' – CCAGGTTGTCCAATAACTGCATC – 3'

Primer R: 5' – CCTTACCAGACTTCCAGGATGGT – 3'

3.8 Statistische Analyse

Die Auswertung des vorliegenden Datenkollektivs erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 18.0. Qualitative Variablen wurden hierfür mit Zahlwerten von 0 oder 1 kodiert. Zur Signifikanz-Analyse wurden je nach Variablenkombination verschiedene Testverfahren verwendet. Waren die zu prüfenden Variablen qualitativ, so kam der χ^2 -Test zur Anwendung. Für quantitative Kofaktoren bei qualitativer abhängiger Variable erfolgte die Analyse mit dem Mann-Whitney-Test. Waren die abhängigen Variablen quantitativ, so wurden mögliche

Zusammenhänge mit Hilfe der linearen Regression überprüft. Als Signifikanz-Niveau galt ein p -Wert $< 0,05$. Für das 95%-Konfidenzintervall war Signifikanz-Kriterium, dass die Zahl 1 nicht enthalten sein durfte. Falls nicht anders angegeben, wurden quantitative Parameter als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Konsistenz der Allelfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) wurde mit einem exakten Fisher-Test geprüft (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>). Bei dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium handelt es sich um ein im Jahr 1908 von Godfrey Harold Hardy und Wilhelm Weinberg abgeleitetes mathematisches Modell aus dem Bereich der Populationsgenetik. Dabei geht man von einer fiktiven, idealen Population aus, in der sich die Häufigkeiten von Allelen und Genotypen aufgrund eines modellierten Gleichgewichts nicht verändern. Die ideale Population ist durch fünf Annahmen gekennzeichnet:

1. Die Population ist ausreichend groß, sodass auch bei Verlust einzelner Individuen die Häufigkeit der Allele nicht abnimmt.
2. Alle Paarungen der Individuen untereinander sind gleich wahrscheinlich und gleich erfolgreich (Panmixie).
3. Selektion ist ausgeschlossen.
4. Es erfolgen keine Mutationen.
5. Genimport oder -export findet nicht statt.

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium lässt sich durch zwei Gleichungen ausdrücken, wobei p die relative Häufigkeit des Auftretens von Allel A ist, und q die relative Häufigkeit des Auftretens von Allel a bezeichnet.

Für die Allele gilt: $p + q = 1$

Für die Genotypen gilt: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Mit Hilfe dieser Formeln kann man die Häufigkeit eines Allels in einer Population berechnen, sofern die Häufigkeiten der Genotypen bekannt sind, oder umgekehrt die Häufigkeit der Genotypen, wenn eine Allelfrequenz bekannt ist. Mit dem χ^2 -Test können Abweichungen vom HWG überprüft werden. Sie können entweder auf einen Verstoß gegen die zugrundeliegenden Annahmen hinweisen (Populationsgröße zu gering, Auftreten von Mutationen) oder ein Zeichen für Fehler bei der Genotypisierung sein.

Bei der vorliegenden Studie wurden u.a. die Allelhäufigkeiten der Patienten ohne SBP (Kontrollen) und die Allelhäufigkeiten der Patienten mit SBP (Fälle) ermittelt.

3.9 Geräte und Reagenzien

DNA-Extraktion:

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
- Qiagen Protease	
- Puffer AL	
- Puffer AW1	
- Puffer AW2	
- Puffer AE	
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipetten 2,5, 10, 20, 100, 200 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
2 ml Collection Tubes	Qiagen
Spin Columns	Qiagen

PCR:

TaqMan 7500 fast	Applied Biosystems
96 PCR Platte	Sarstedt
MicroAMP Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Mastermix Invitrogen Platinum qPCR	Invitrogen
ROX (Referenz)	Invitrogen
Sonden VIC und FAM	Applied Biosystems
Primer	MWG Biotech
Aqua bidest. „LiChrosolv“	Merck

Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit:

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH
Pulse Vortexer Vibra Mix	Denley
Pipette 2,5 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präzisionswischtücher Kimtech science	Kimberly-Clark Professional

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Zu Beginn wurden 183 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites in die Studie eingeschlossen, wovon 26 Personen im Laufe der Auswertung entfielen, da sie die Einschlusskriterien nicht vollständig erfüllten (siehe Abschnitt 3.1). So ergab sich insgesamt ein Kollektiv von 157 Patienten. Die Patienten wurden entweder in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums des Saarlandes ($n = 25$), in der Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Gastroenterologie/Hepatology/Infektiologie des Universitätsklinikums Jena ($n = 27$) oder in den Kliniken für Innere Medizin I und II des Universitätsklinikums Regensburg ($n = 105$) stationär wegen Leberzirrhose mit konsekutiv aufgetretenem Aszites behandelt.

Das Alter der Patienten in diesem Gesamtkollektiv lag zwischen 26 und 79 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter 56,7 ($\pm 10,0$) Jahre betrug (Median 56,0, Spannweite 53). Zum Kollektiv gehörten 50 Frauen (31,8%) und 107 Männer (68,2%). Das Alter der weiblichen Patienten lag zwischen 39 und 79 Jahren (Durchschnittsalter 56,9 [$\pm 9,9$] Jahre). Die Altersspannweite der männlichen Patienten reichte von 26 bis 78 Jahren (Durchschnittsalter 56,7 [$\pm 10,1$] Jahre). Bezogen auf die drei Subkollektive war die Altersverteilung relativ gleichmäßig (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$). Die Patienten waren statistisch im Durchschnitt alle etwa gleich alt (Abbildung 5).

Das Überleben der Patienten wurde, falls möglich, dokumentiert. 25 Personen verstarben. Tabelle 4 gibt einen Überblick über alle Grunderkrankungen im Kollektiv. Die weitaus häufigste Ursache für die Zirrhose der Patienten war mit 70,1% ein Alkoholabusus. Bei 151 Patienten konnte der Child-Pugh-Score ermittelt werden, wobei die Mehrheit der Patienten Child B (43%) oder Child C (50,3%) aufwies (Tabelle 5). Der durchschnittliche MELD-Score, der bei 122 Patienten errechnet wurde, lag bei 18,5 ($\pm 7,8$) Punkten. Dieser MELD-Score entspricht in etwa einer Wahrscheinlichkeit von 20 %, innerhalb der nächsten 3 Monate zu versterben (siehe dazu: <http://www.mayoclinic.org/meld/mayomodel7.html>).

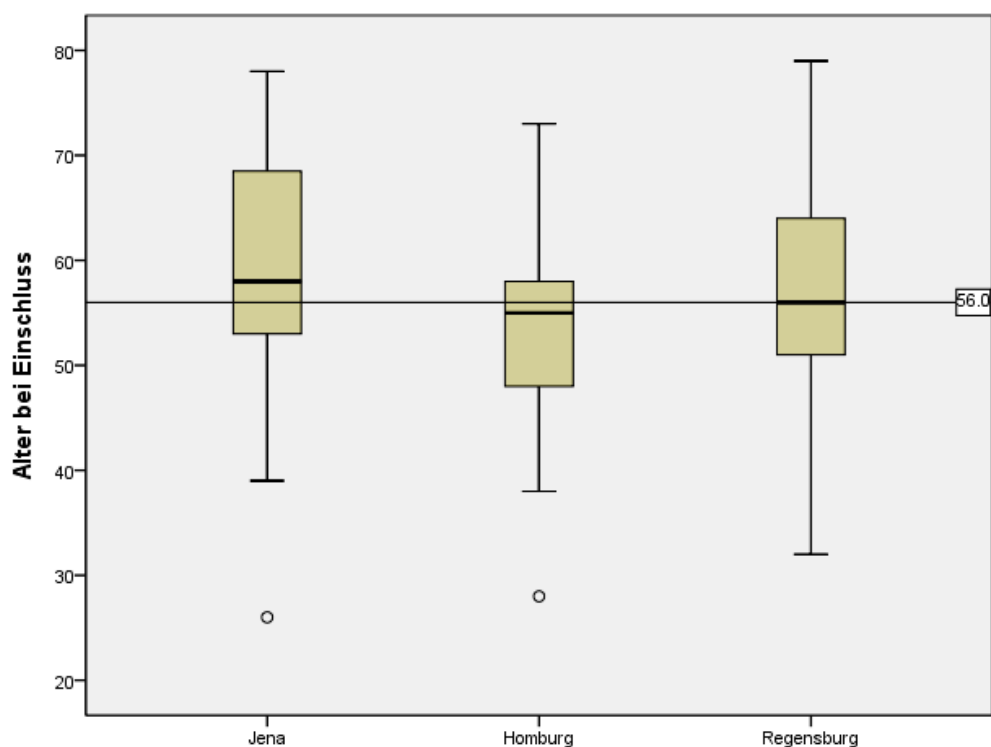


Abb. 5: Durchschnittliche Altersverteilung in den drei Kollektiven Jena, Homburg und Regensburg. Box-Whisker-Plot; Gesamtkollektiv: Median 56,0 Jahre, Spannweite 53 Jahre.

Tabelle 4 : Grunderkrankungen im Gesamtkollektiv.

	Häufigkeit	Prozent
Alkohol / nutritiv toxisch	110	70,1
Hepatitis B	4	2,5
Hepatitis C	12	7,6
Hämochromatose	1	0,6
primär sklerosierende Cholangitis	3	1,9
primär biliäre Zirrhose	1	0,6
medikamentös-toxisch	1	0,6
NASH	3	1,9
Overlap Syndrom	1	0,6
Autoimmune Genese	1	0,6
Alkohol und Hepatitis B	1	0,6
Alkohol und Hepatitis C	6	3,8
Hepatitis B und C	1	0,6
Zirrhose unklarer Genese / unbekannt	12	7,6
Gesamt	157	100,0

Tabelle 5: Verteilung des Child-Pugh-Scores.

		Häufigkeit	Prozent	Gültig [%]
Gültig	Child A	10	6,4	6,6
	Child B	65	41,4	43,0
	Child C	76	48,4	50,3
	Gesamt	151	96,2	100,0
Fehlend		6	3,8	
Gesamt		157	100,0	

4.2 Demographische und klinische Parameter der Subkollektive Homburg, Jena und Regensburg

4.2.1 Patientenkollektiv Homburg

Das Alter der Patienten im Homburger Kollektiv lag zwischen 28 und 73 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter 53,0 ($\pm 10,3$) Jahre betrug (Median 55,0, Spannweite 45). Zum Kollektiv gehörten 10 Frauen (40%) und 15 (60%) Männer. Das Alter der weiblichen Patienten lag zwischen 39 und 73 Jahren (Durchschnittsalter 54,6 [$\pm 10,6$] Jahre). Die Altersspannweite der männlichen Patienten reichte von 28 bis 69 Jahren (Durchschnittsalter 52 [$\pm 10,3$] Jahre). Bei den aufgenommenen Patienten wurde, wenn möglich, ein Follow-up durchgeführt, um den weiteren Krankheitsverlauf zu dokumentieren. Im Falle einer Lebertransplantation, des Todes oder bei nicht möglicher Kontaktaufnahme wurde der Follow-up beendet. Das Überleben wurde nach 6 und nach 12 Monaten festgehalten. Nach einem halben Jahr war die Variable aber nur für 49 Patienten zu dokumentieren, davon waren 25 Personen in der Zwischenzeit verstorben. Nach einem Jahr lag nur für 30 Patienten eine Information bezüglich des Überlebens vor. Aufgrund dieses geringen Datensatzes für die Variable „Mortalität“ konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer *NOD2*-Mutation und dem Überleben der Patienten gefunden werden.

In Tabelle 6 sind die einzelnen Grunderkrankungen der eingeschlossenen Patienten mit ihrer Häufigkeit aufgeführt. Bei dem überwiegenden Anteil der Patienten lag der Zirrhose ein Alkoholabusus zugrunde ($n = 20$; 80%). Der Schweregrad der Leberzirrhose wurde anhand des Child-Pugh-Scores erfasst und verteilte sich wie folgt auf die Patienten: 2 Patienten Child A (8%), 10 Patienten Child B (40%) und 13 Patienten Child C (52%). Der MELD-Score wurde bei 24 Patienten ermittelt und betrug im Durchschnitt 19,0 ($\pm 4,9$) Punkte. Das entspricht einer 3-Monats-Mortalität von etwa 22 Prozent.

Tabelle 6: Grunderkrankungen und deren Häufigkeit im Patientenkollektiv Homburg.

	Häufigkeit	Prozent
Alkohol / nutritiv toxisch	20	80,0
Hepatitis C	2	8,0
primär sklerosierende Cholangitis	1	4,0
medikamentös-toxisch	1	4,0
Hepatitis C und Alkohol	1	4,0
Gesamt	25	100,0

4.2.2 Patientenkollektiv Jena

Das Alter der Patienten im in Jena untersuchten Kollektiv lag zwischen 26 und 78 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter 59,4 ($\pm 11,8$) Jahre betrug (Median 58,0, Spannweite 52). Zum Kollektiv gehörten neun Frauen (33,3%) und 18 Männer (66,7%). Das Alter der weiblichen Patienten lag zwischen 39 und 78 Jahren (Durchschnittsalter 61,2 [$\pm 13,2$] Jahre). Die Altersspannweite der männlichen Patienten reichte von 26 bis 70 Jahren (Durchschnittsalter 58,4 [$\pm 11,3$] Jahre).

Bei den eingeschlossenen Patienten wurde, wenn möglich, ein Follow-up durchgeführt. Acht Patienten verstarben. In Tabelle 7 sind die einzelnen Grunderkrankungen der eingeschlossenen Patienten mit ihrer Häufigkeit aufgeführt. Bei dem überwiegenden Anteil der Patienten handelte es sich bei der für die Zirrhose ursächlichen Erkrankung um einen Alkoholabusus ($n = 21$; 77,8%). Der Schweregrad der Leberzirrhose wurde anhand des Child-Pugh-Scores erfasst und verteilte sich wie folgt auf die Patienten: 2 Patienten Child A (7,4%), 11 Patienten Child B (40,7%) und 14 Patienten Child C (51,9%).

Tabelle 7: Grunderkrankungen und deren Häufigkeit im Patientenkollektiv Jena.

	Häufigkeit	Prozent
Alkohol / nutritiv toxisch	21	77,8
Hepatitis B	1	3,7
Hepatitis C	1	3,7
Hämochromatose	1	3,7
Hepatitis B und Alkohol	1	3,7
unbekannt	2	7,4
Gesamt	27	100,0

4.2.3 Patientenkollektiv Regensburg

Das Alter der Patienten im in Regensburg untersuchten Kollektiv lag zwischen 32 und 79 Jahren, wobei das durchschnittliche Alter 56,9 ($\pm 9,3$) Jahre betrug (Median 56,0, Spannweite 47). Zum Kollektiv gehörten 31 Frauen (29,5%) und 74 Männer (70,5%). Das Alter der weiblichen Patienten lag zwischen 40 und 79 Jahren (Durchschnittsalter 56,4 [$\pm 8,6$] Jahre). Die Altersspannweite der männlichen Patienten reichte von 32 bis 78 Jahren (Durchschnittsalter 57,2 [$\pm 9,6$] Jahre).

Bei den eingeschlossenen Patienten wurde, wenn möglich, ein Follow-up durchgeführt. 12 Patienten verstarben. In Tabelle 8 sind die einzelnen Grunderkrankungen der eingeschlossenen Patienten mit ihrer Häufigkeit aufgeführt. Auch hier war überwiegend ein Alkoholabusus die Ursache für die Zirrhose der Patienten ($n = 69$; 65,7%). Der Schweregrad der Leberzirrhose wurde anhand des Child-Pugh-Scores bei 99 der eingeschlossenen Patienten erfasst und verteilte sich wie folgt: 6 Patienten Child A (6,1%), 44 Patienten Child B (41,9%) und 49 Patienten Child C (46,7%).

Tabelle 8: Grunderkrankungen und deren Häufigkeit im Patientenkollektiv Regensburg.

	Häufigkeit	Prozent
Alkohol / nutritiv toxisch	69	65,7
Hepatitis B	3	2,9
Hepatitis C	9	8,6
Hämochromatose	2	1,9
Primär biliäre Zirrhose	1	1,0
Autoimmune Genese	1	1,0
NASH	3	2,9
Overlap Syndrom	1	1,0
Ethanol + Hepatitis C	5	4,8
Hepatitis B und C	1	1,0
Zirrhose unklarer Genese / unbekannt	10	9,5
Gesamt	105	100,0

4.3 Ätiologie und Konsequenzen der Leberzirrhose

Bei 143 Patienten wurde die Variable „Alkoholkonsum“ registriert. War sie positiv, so bedeutete dies einen regelmäßigen Konsum. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass kein standardisiertes Assessment durchgeführt wurde. Von den 143 Patienten tranken nur 28 Personen nicht regelmäßig Alkohol. Wie oben bereits aufgeführt (Tabellen 6 - 8), war in allen drei

Patientenkollektiven der Alkoholabusus mit weit über 50% die häufigste Ursache für die Entstehung der Zirrhose. Hierbei war auffällig, dass von den 115 Patienten mit Alkoholanamnese 88 Personen (76,5%) Männer und nur 27 (23,5%) Frauen waren (Tabelle 9). Es lag somit ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem Alkoholkonsum vor (χ^2 -Test, $p = 0,005$; Abbildung 7).

Tabelle 9: Häufigkeit des Alkoholkonsums im Kollektiv, bezogen auf das Geschlecht.

	Frau	Mann	Gesamt
Alkoholkonsum nein	14	14	28
ja	27	88	115
Gesamt	41	102	143

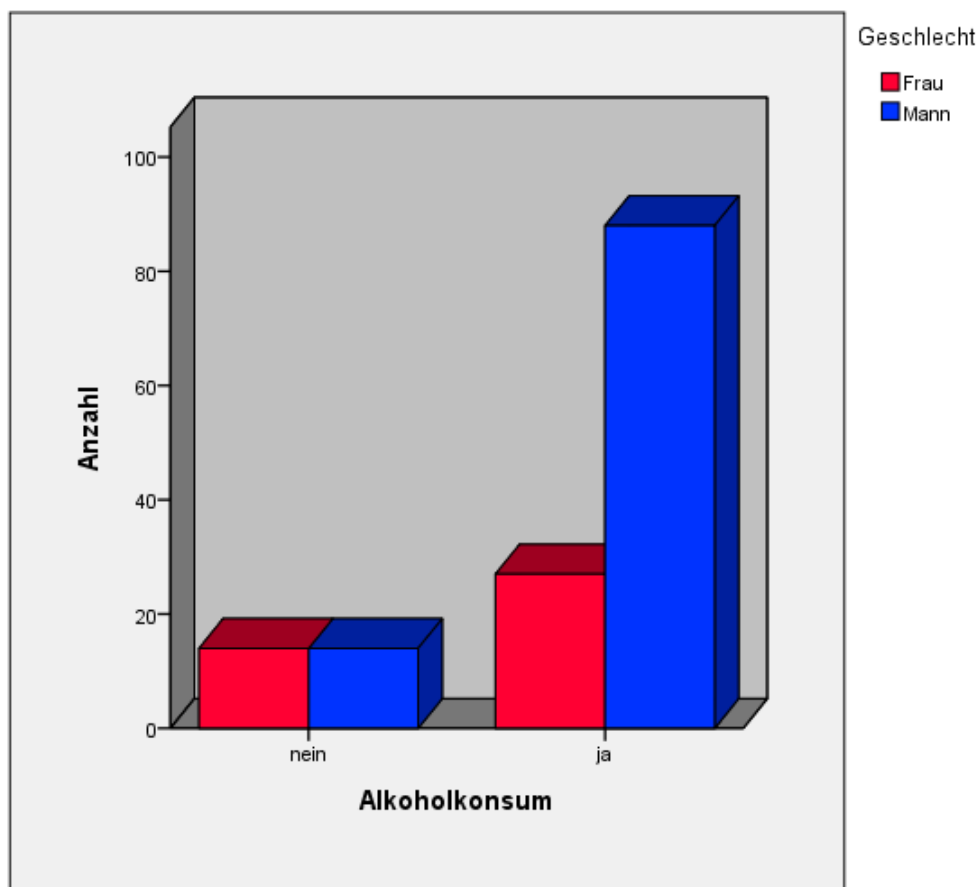


Abb. 7: Einfluss des Geschlechts auf den Alkoholkonsum. Gruppiertes Balkendiagramm. Im Gesamtkollektiv konsumierten deutlich mehr Männer Alkohol als Frauen.

Desweiteren zeigte sich, dass der Alkoholkonsum auch vom durchschnittlichen Alter der Patienten abhing. Bei den Patienten, die keinen Alkohol konsumierten, lag es bei 60,0 (\pm 12) Jahren, wohingegen die Patienten mit Alkoholkonsum im Durchschnitt 55,5 (\pm 9,1) Jahre alt waren (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,011$; Abbildung 8).

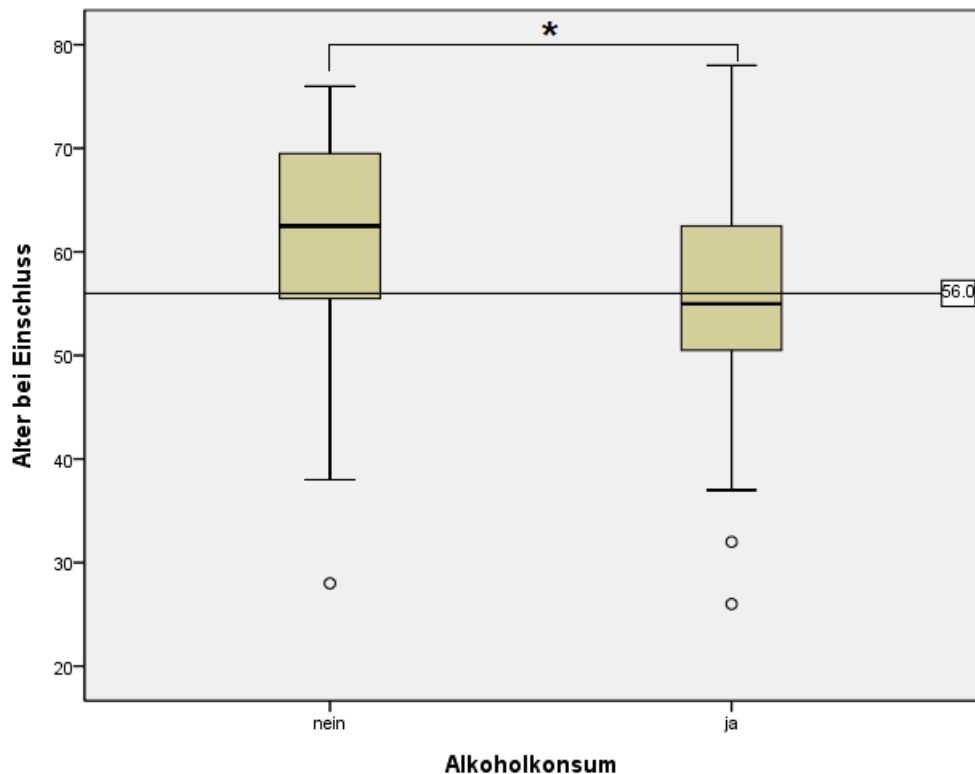


Abb. 8: Einfluss des Alters auf den Alkoholkonsum. Box-Whisker-Plot, $p < 0,05$, Median 56,0 Jahre. Patienten mit regelmäßigem Alkoholkonsum waren im Durchschnitt jünger ($55 \pm 9,1$ Jahre) als abstinenten Patienten ($60,0 \pm 12$ Jahre).

4.4 Diagnose einer Aszites-Infektion

4.4.1 SBP und andere Infektionsparameter

Bei den teilnehmenden Patienten wurde eine SBP-Diagnostik durchgeführt (155 Patienten) und/oder eine Asziteskultur angelegt (89 Patienten). Wenn möglich, wurden auch die Variablen „Bacteraszites“ und „CNNA“ erfasst (siehe Abschnitt 3.6). Der Nachweis von mehr als 250 neutrophilen Granulozyten pro μ l Aszites oder mehr als 500 Leukozyten pro μ l war das Kriterium für die Diagnose einer SBP. Bei Patienten mit bekannter Leukozytenzahl und dem

Anteil der Neutrophilen in Prozent wurde die absolute Neutrophilen-Zahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Neutrophile } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Leukozyten } [\mu\text{l}] \times \text{Neutrophile } [\%]}{100}$$

In der Gesamtkohorte wurde bei 25 Patienten (16,1%) eine SBP festgestellt. Die Asziteskultur war in 13 Fällen (14,6 %) positiv. 84 Patienten konnten auf das Vorliegen eines Bacteraszites oder eines CNNA überprüft werden. Dabei ließ sich bei 10 Patienten (11,9 %) ein CNNA und bei zwei Patienten (2,4%) ein Bacteraszites diagnostizieren (Tabelle 10).

Tabelle 10: Häufigkeit einer positiven Asziteskultur und der Komplikationen SBP, CNNA und Bacteraszites im Patientenkollektiv.

			Häufigkeit	Prozent	Gültig [%]
Asziteskultur	Gültig	negativ	76	48,4	85,4
		positiv	13	8,3	14,6
		Gesamt	89	56,7	100,0
	Fehlend		68	43,3	
	Gesamt		157	100,0	
SBP	Gültig	negativ	130	82,8	83,9
		positiv	25	15,9	16,1
		Gesamt	155	98,7	100,0
	Fehlend		2	1,3	
	Gesamt		157	157	100,0
CNNA	Gültig	negativ	74	47,1	88,1
		positiv	10	6,4	11,9
		Gesamt	84	53,5	100,0
	Fehlend		73	46,5	
	Gesamt		157	100,0	
Bacteraszites	Gültig	negativ	82	52,2	97,6
		positiv	2	1,3	2,4
		Gesamt	84	53,5	100,0
	Fehlend		73	46,5	
	Gesamt		157	100,0	

Zwischen der Diagnose „SBP“ und den Einflussfaktoren auf den Schweregrad der Zirrhose wie z.B. MELD-Score, Child-Pugh-Score, hepatischer Enzephalopathie oder Gerinnung ließ sich kein statistisch relevanter Zusammenhang nachweisen.

Aufgeschlüsselt nach den Einzelparametern, die in die Berechnung des MELD- bzw. des Child-Pugh-Scores einfließen (siehe Abschnitt 3.3.1), ließ sich nur für die Serum-Bilirubin-

Konzentration ein Zusammenhang mit dem Auftreten einer SBP finden. Der Mann-Whitney-U-Test auf eine Assoziation zwischen der Gesamtbilirubin-Konzentration im Blut und dem Vorliegen einer SBP ergab zwar mit 0,102 einen nicht signifikanten p-Wert, aber das Boxplot-Diagramm zeigt, dass bei positiver SBP die Bilirubin-Konzentration im Schnitt deutlich höher war als bei Patienten ohne SBP (Abbildung 9).

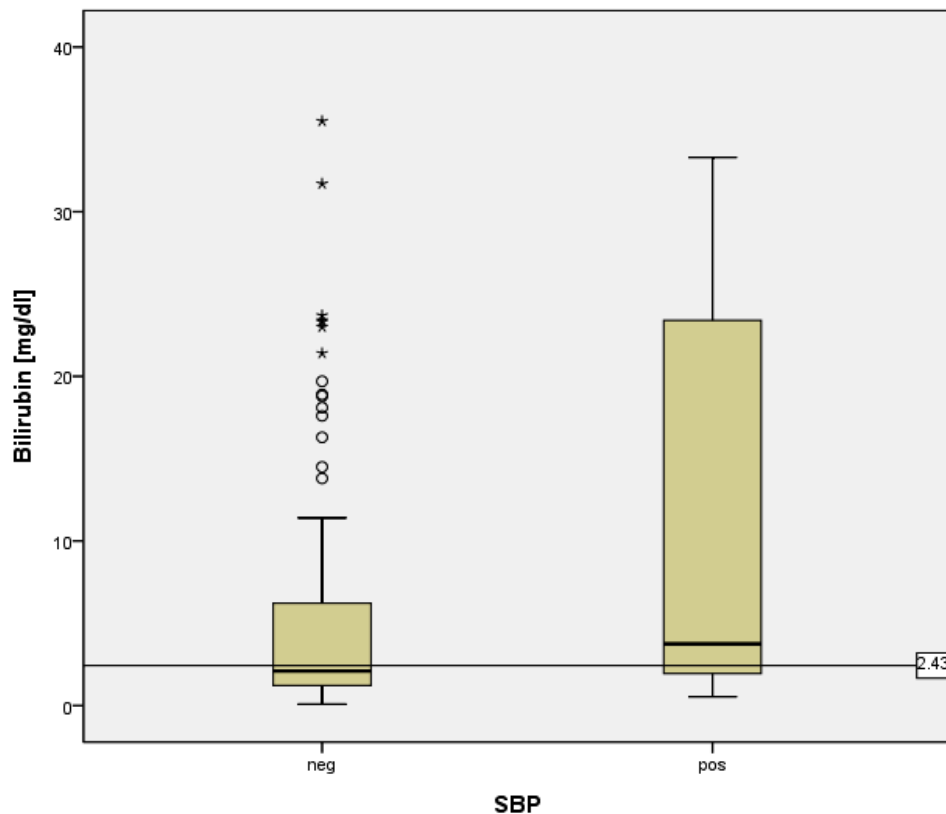


Abb. 9: Zusammenhang zwischen der Bilirubin-Konzentration im Blut und Vorliegen einer SBP. Box-Whisker-Plot, Median 2,4 mg/dl. Patienten mit SBP haben erhöhte Serum-Bilirubin-Werte.

Der Zusammenhang zwischen dem CRP-Wert als Entzündungsmarker im Blut und dem Vorliegen einer SBP war ebenfalls nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,068$), ließ aber die Tendenz erkennen, dass bei SBP der CRP-Wert erhöht war.

Für andere Variablen wie z.B. Alter bei Einschluss, Geschlecht oder Alkoholkonsum der Patienten konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten einer SBP nachgewiesen werden.

4.4.2 CNNA und Bacteraszites

In der statistischen Analyse auf Zusammenhänge zwischen den Variablen „CNNA“ und „Bacteraszites“ (siehe Tabelle 10) mit anderen Faktoren zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines CNNA und der Höhe der Bilirubin-Konzentration. Diese war signifikant höher als bei den Patienten ohne CNNA (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,027$; Abbildung 10).

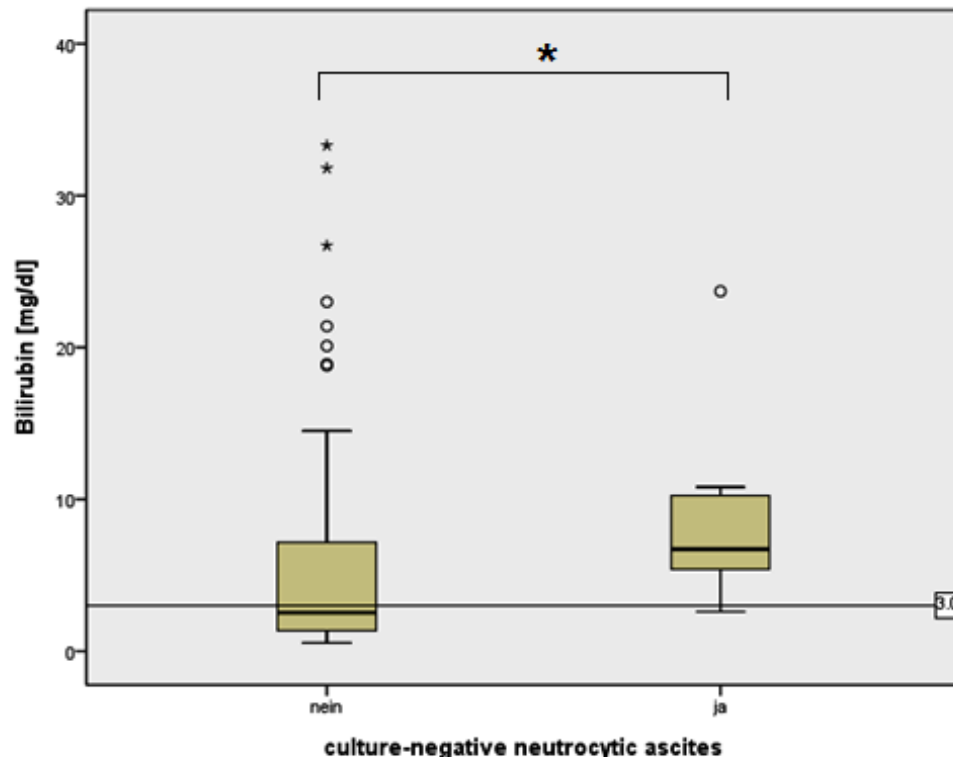


Abb. 10: Zusammenhang zwischen Bilirubin-Konzentration im Serum und Vorliegen eines CNNA. Box-Whisker-Plot, $p < 0,05$, Median 3,0 mg/dl. Patienten mit CNNA haben signifikant höhere Bilirubin-Werte als Patienten ohne diese Komplikation.

Dieses Ergebnis spricht für eine Assoziation zwischen dem Schweregrad der Leberzirrhose und der Diagnose „CNNA“. Unterstützt wurde diese Annahme durch die – zwar nicht signifikanten (Mann-Whitney-U-Test) – aber tendenziell positiv mit dem CNNA korrelierenden Faktoren MELD-Score ($p = 0,071$), Albumin-Konzentration ($p = 0,060$) und INR ($p = 0,104$). Dies deutet darauf hin, dass ein CNNA – ebenso wie die SBP – eher bei Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose auftritt. Für die Diagnose „Bacteraszites“ ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen, was in erster Linie auf die geringe Fallzahl ($n = 2$) dieser Infektionsform im Kollektiv zurückzuführen ist.

4.5. Hardy-Weinberg-Äquilibrium

4.5.1 *NOD2*-Genotypisierung

Bei insgesamt 104 Patienten konnte aus entnommenem EDTA-Blut bzw. aus Aszites-Punktat (2 Patienten) DNA isoliert und auf die drei Varianten p.R702W, p.G908R und c.3020insC des *NOD2*-Gens untersucht werden. Bei 53 Personen aus dem Subkollektiv Regensburg wurde keine Genotypisierung vorgenommen. Insgesamt wurde bei 10 Patienten (9,6%) eine heterozygote Variante von p.R702W festgestellt. 5 Patienten wiesen die heterozygote Form von p.G908R (4,8%) auf, und bei 9 Patienten (8,7%) wurde die heterozygote Form von c.3020insC ermittelt. Bis auf eine Patientin, bei der sowohl die heterozygote Variante von p.G908R als auch die heterozygote Variante von c.3020insC vorlag, trugen die Patienten jeweils nur eine Mutation. Bei keinem lag eine Variante homozygot vor. Die übrigen 81 Patienten trugen alle Wildtyp-Allele (Tabelle 11).

Tabelle 11: Häufigkeit der *NOD2*-Mutationen im Gesamtkollektiv.

		Häufigkeit	Prozent
Vorhandensein einer der drei <i>NOD2</i> -Varianten (p.R702W / p.G908R / c.3020insC)	Nein	81	77,9
	Ja	23	22,1
	Gesamt	104	100,0
p.R702W	Wildtyp	94	90,4
	Heterozygot	10	9,6
	Gesamt	104	100,0
p.G908R	Wildtyp	99	95,2
	Heterozygot	5	4,8
	Gesamt	104	100,0
c.3020insC	Wildtyp	95	91,3
	Heterozygot	9	8,7
	Gesamt	104	100,0

4.5.2 Ergebnisse nach Testung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Bei der vorliegenden Studie wurden die Allelhäufigkeiten der Patienten ohne SBP (Kontrollen) und die Allelhäufigkeiten der Patienten mit SBP (Fälle) ermittelt. Die Allelfrequenzen aller untersuchten Polymorphismen in der Fall- und Kontrollgruppe befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Gleiches galt für die Gesamtkohorte.

Die Abbildungen 11 - 13 zeigen die de-Finetti-Diagramme für die einzelnen Mutationen. Es handelt sich dabei um nach dem italienischen Statistiker Bruno de Finetti benannte Diagramme in Form gleichseitiger Dreiecke mit Hardy-Weinberg-Parabel. Auf der x-Achse ist die Häufigkeit von Allel 2 aufgetragen, das in der vorliegenden Arbeit dem Wildtyp-Allel entspricht (siehe Punkt 3.7.4). Die Parabel ergibt sich aus den mathematischen Formeln des HWG, sie liefert mögliche Lagepunkte für die Hardy-Weinberg-Gleichgewichte. Jeder Populationszustand kann durch einen Punkt innerhalb des Dreiecks dargestellt werden. Da die Summe aller Höhen in einem gleichseitigen Dreieck mit der Seitenlänge 1 ebenfalls gleich 1 ist, können die Häufigkeiten der drei Genotypen auf zwei Seiten und der vertikalen y-Achse abgelesen werden.

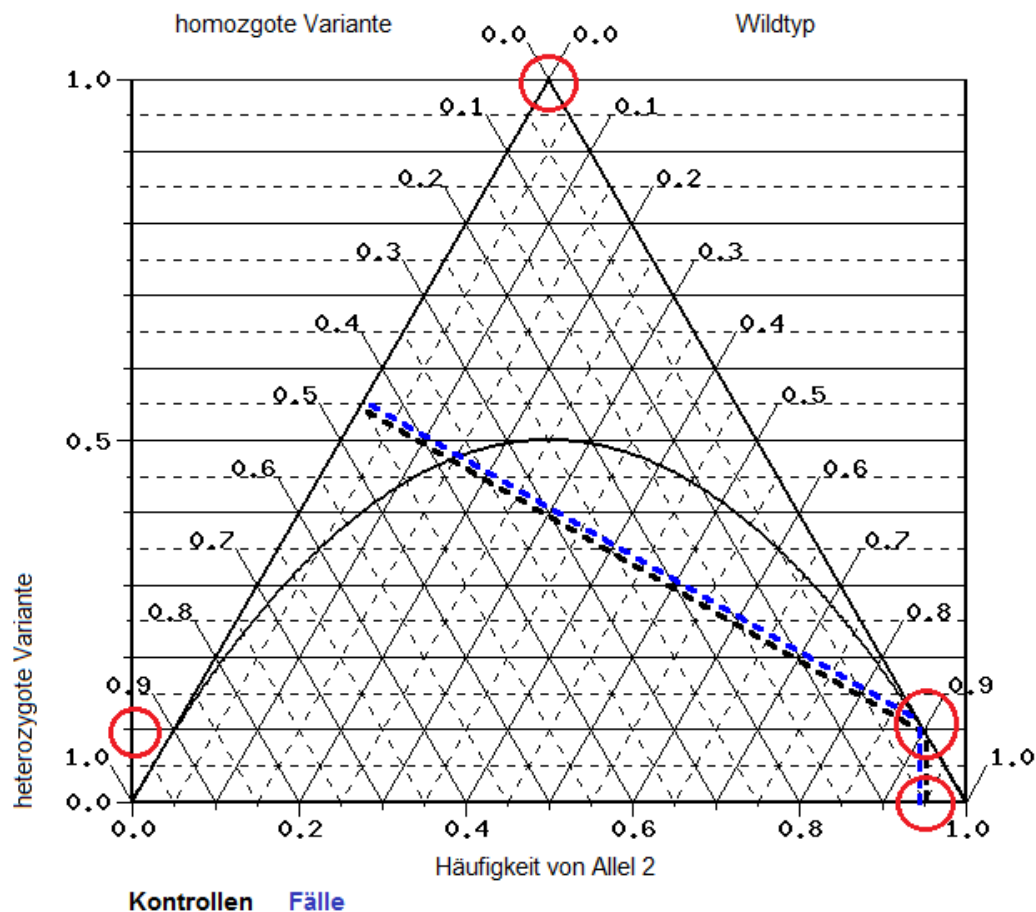


Abb. 11: de-Finetti-Diagramm mit Hardy-Weinberg-Parabel für die Variante p.R702W. Das Diagramm unterscheidet zwischen Fällen (Patienten mit SBP, blaue Linie) und Kontrollen (Patienten ohne SBP, schwarze Linie). Die roten Kreise zeigen die Ablespunkte für die Genotyp-Häufigkeiten bzw. die Häufigkeit von Allel 2 an. Letztere ist auf der x-Achse aufgetragen. Allel 2 entspricht hier dem Wildtyp-Allel. Zwischen Fällen und Kontrollen unterschieden sich die Allelfrequenzen nicht. Allel 2 lag bei ~ 95% und p.R702W bei 5% der Fälle vor.

An den beiden Schrägen des Dreiecks sowie der y-Achse lässt sich die Verteilung der Genotypen ablesen. Die rechte Schräge des Dreiecks bildet den Wildtyp ab, etwa 90% der Patienten zeigten diesen Genotyp. Die linke Schräge entspricht der Achse „homozygote Variante“, die jedoch bei keinem der Patienten vorlag. Auf der vertikalen y-Achse ist die Häufigkeit der heterozygoten Variante abgebildet. In diesem Fall trugen etwa 10% der Patienten diese Mutationsform.

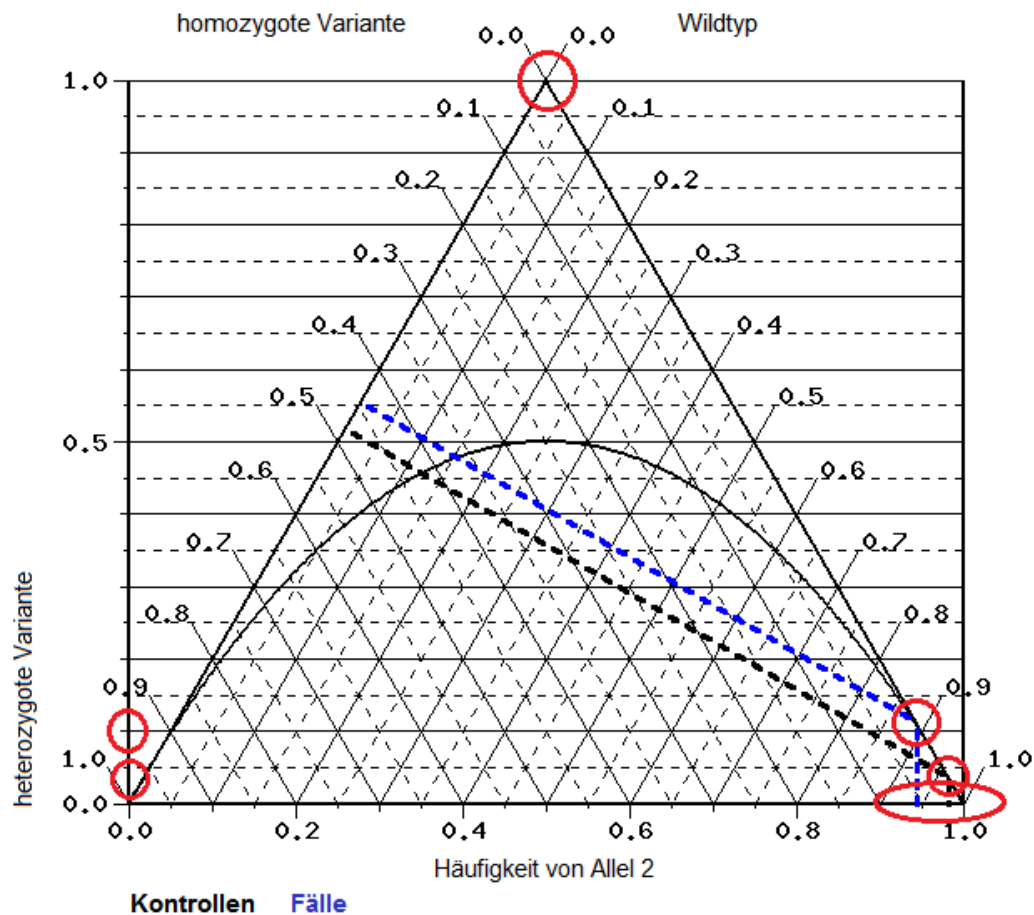


Abb. 12: de-Finetti-Diagramm mit Hardy-Weinberg-Parabel für die Variante p.G908R. Das Diagramm unterscheidet zwischen Fällen (Patienten mit SBP, blaue Linie) und Kontrollen (Patienten ohne SBP, schwarze Linie). Die roten Kreise zeigen die Ablespunkte für die Genotyp-Häufigkeiten bzw. die Häufigkeit von Allel 2 an. Letztere ist auf der x-Achse aufgetragen. Allel 2 entspricht hier dem Wildtyp-Allel. Zwischen Fällen und Kontrollen bestand bei der Allelfrequenz ein sichtbarer, jedoch nicht signifikanter Unterschied. Allel 2 lag bei den Patienten mit SBP (Fälle) in ~ 95% und p.G908R in 5% der Fälle vor. Bei den Kontrollen wiesen fast 100% der Patienten Allel 2 auf. Etwa 90% der Patienten mit SBP trugen den Wildtyp-Genotyp, 10% waren heterozygot. Die Kontrollen wiesen bei ~ 95% den Wildtyp und bei ~ 5% die heterozygote Variante auf. Die homozygote Form der Mutation lag bei keinem Patienten vor.



Etwa 80% der Patienten mit SBP wiesen den Wildtyp und 20% die heterozygote Variante auf. Bei den Kontrollen zeigten ~ 95% den Wildtyp und 5% die heterozygote Variante. Die homozygote Form der Mutation lag bei keinem Patienten vor.

4.6 *NOD2*-Genotypisierung

4.6.1 *NOD2*-Mutationen und SBP

Von 104 für *NOD2*-Mutationen genotypisierten Personen wurde bei 18 Patienten zu Beginn oder im stationären Verlauf eine SBP diagnostiziert; bei 86 Patienten trat keine SBP auf. SBP-Episoden in der Vorgeschichte wurden nicht erfasst. 7 Personen wiesen gleichzeitig eine *NOD2*-Variante und eine SBP auf. Zwei Patienten waren Träger von p.R702W, zwei trugen p.G908R und vier Personen zeigten c.3020insC. Hierbei war eine Patientin allerdings gleichzeitig Trägerin sowohl von p.G908R als auch von c.3020insC (Tabelle 12). Es ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer SBP und dem Vorhandensein von c.3020insC feststellen ($p = 0,046$; Abbildung 14). Für p.R702W und p.G908R oder das Vorliegen einer der drei getesteten Varianten war keine statistisch relevante Assoziation nachweisbar.

Tabelle 12: Häufigkeit einer SBP bei Patienten mit *NOD2*-Mutation.

		SBP positiv	SBP negativ	Gesamt
Vorhandensein einer der drei <i>NOD2</i> -Varianten (p.R702W / p.G908R / c.3020insC)	Nein	11	70	
	Ja	7	16	
	Gesamt	18	86	104
p.R702W	Wildtyp	16	78	
	Heterozygot	2	8	
	Gesamt	18	86	104
p.G908R	Wildtyp	16	83	
	Heterozygot	2	3	
	Gesamt	18	86	104
c.3020insC	Wildtyp	14	81	
	Heterozygot	4	5	
	Gesamt	18	86	104

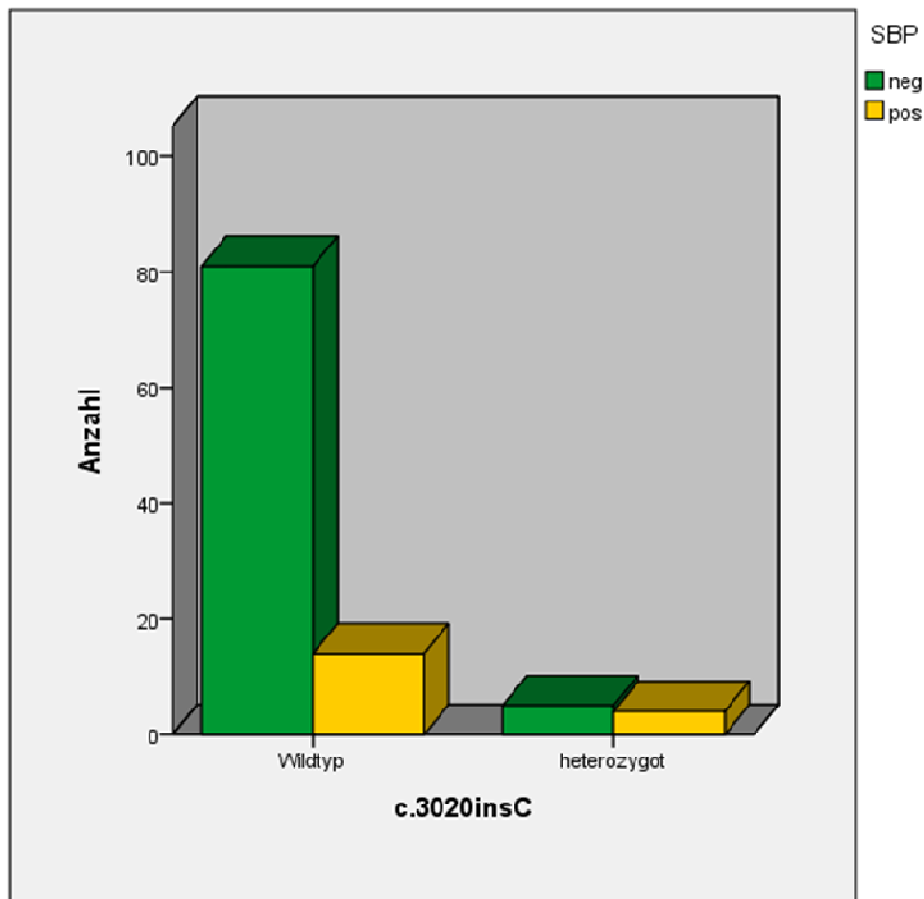


Abb. 14: Zusammenhang zwischen der Mutation c.3020insC und Auftreten einer SBP. Gruppiertes Balkendiagramm. Die Grafik zeigt, dass Träger der c.3020insC-Variante relativ häufiger eine SBP aufwiesen als Patienten mit genetischem Wildtyp.

Bei Überprüfung dieser Ergebnisse in weiteren Kontingenztafeln zeigte sich, dass Patienten mit der heterozygoten Form von c.3020insC im Vergleich zur Wildtyp-Population ein etwa 4,6-fach höheres Risiko hatten, eine SBP zu entwickeln. Der p-Wert lag bei $\sim 0,02$. Für die anderen beiden Mutationen, p.R702W und p.G908R, war kein signifikanter Zusammenhang feststellbar. Allerdings zeigte sich bei p.G908R eine leichte Tendenz zu einer Erhöhung des SBP-Risikos. Anders als bei der Asziteskultur (siehe Abschnitt 4.6.2) war für das Vorliegen einer der drei Mutationen kein Zusammenhang zur Variable „SBP“ nachweisbar (Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Tests der Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer Mutation und dem Auftreten einer SBP.

	Allele	Genotypen
p.R702W	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 1,206 C.I. = [0,245 – 5.930] p = 0,77048	Odds ratio = 1,219 C.I. = [0,236 – 6.284] p = 0,81288
p.G908R	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 3,314 C.I. = [0,533 – 20,590] p = 0,37134	Odds ratio = 3,458 C.I. = [0,534 – 22,383] p = 0,16922
c.3020insC	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 4,175 C.I. = [1,063 – 16,399] p = 0,09454	Odds ratio = 4,629 C.I. = [1,106 – 19,379] p = 0,02435
p.R702W / p.G908R / c.3020insC	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 2,353 C.I. = [0,890 – 6,224] p = 0,08758	Odds ratio = 2,784 C.I. = [0,934 – 8,299] p = 0,05935

4.6.2 NOD2-Mutationen und Asziteskultur

Die Variable „Asziteskultur“ wurde für 89 Patienten des Gesamtkollektivs bestimmt, 63 davon waren genotypisiert. Innerhalb dieser Gruppe war das Kulturergebnis bei insgesamt 51 Personen negativ und bei 12 positiv. Sechs Patienten wiesen gleichzeitig eine Mutation und ein positives Kulturergebnis auf. Hierbei waren drei Patienten Träger von p.R702W, zwei Patienten zeigten p.G908R und zwei c.3020insC, wobei eine Patientin sowohl p.G908R als auch p.R702W aufwies (Tabelle 14). Bei Prüfung mit dem χ^2 -Test schien das Vorliegen der heterozygoten Form von p.R702W mit dem Auftreten einer positiven Asziteskultur assoziiert zu sein ($p = 0,044$). Die Patienten mit dieser Mutation zeigten häufiger eine positive statt einer negativen Asziteskultur (Abbildung 15).

Tabelle 14: Häufigkeit einer positiven Asziteskultur bei Patienten mit SNP.

		Asziteskultur positiv	Asziteskultur negativ	Gesamt
Vorhandensein einer der drei NOD2-Varianten (p.R702W / p.G908R / c.3020insC)	Nein	6	43	
	Ja	6	8	
	Gesamt	12	51	63
p.R702W	Wildtyp	9	49	
	Heterozygot	3	2	
	Gesamt	12	51	63
p.G908R	Wildtyp	10	50	
	Heterozygot	2	1	
	Gesamt	12	51	63
c.3020insC	Wildtyp	10	46	
	heterozygot	2	5	
	Gesamt	12	51	63

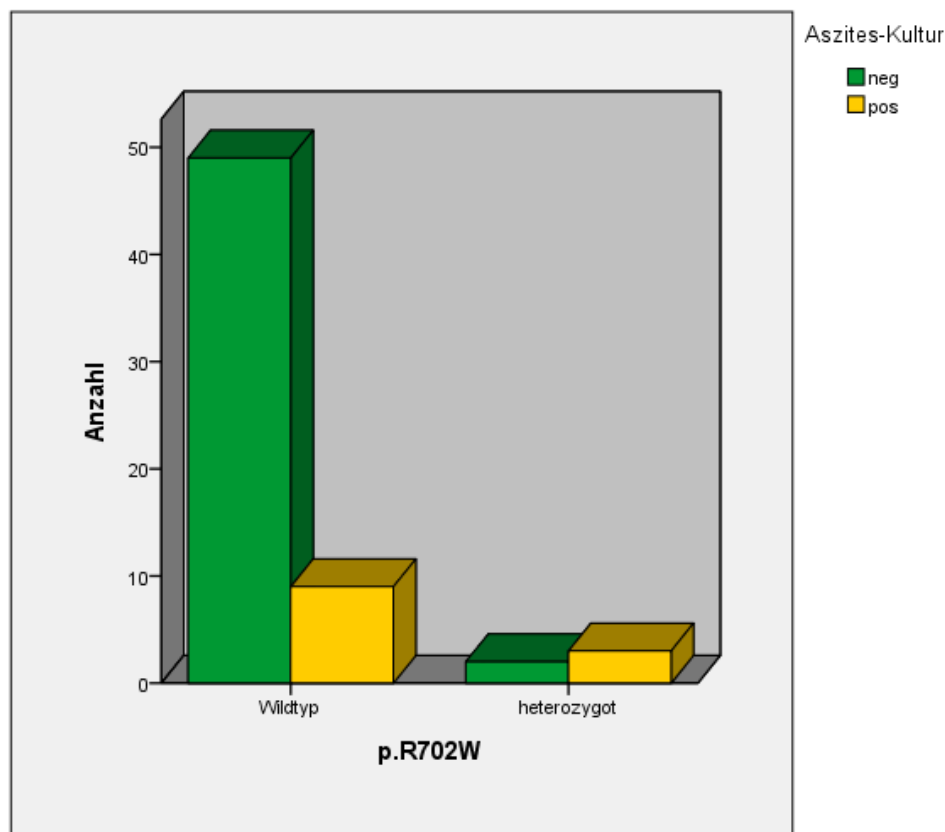


Abb. 15: Zusammenhang zwischen Variante p.R702W und Auftreten einer positiven Asziteskultur. Gruppiertes Balkendiagramm. Träger von p.R702W zeigten häufiger eine positive Asziteskultur als Patienten mit genetischem Wildtyp.

Für p.G908R ergab sich mit einem p-Wert von 0,09 keine Signifikanz. Graphisch zeigte sich dennoch eine Tendenz zu einem positiven Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Vorliegen eines positiven Kulturergebnisses (Abbildung 16). Für c.3020insC ergab sich kein signifikanter Zusammenhang.

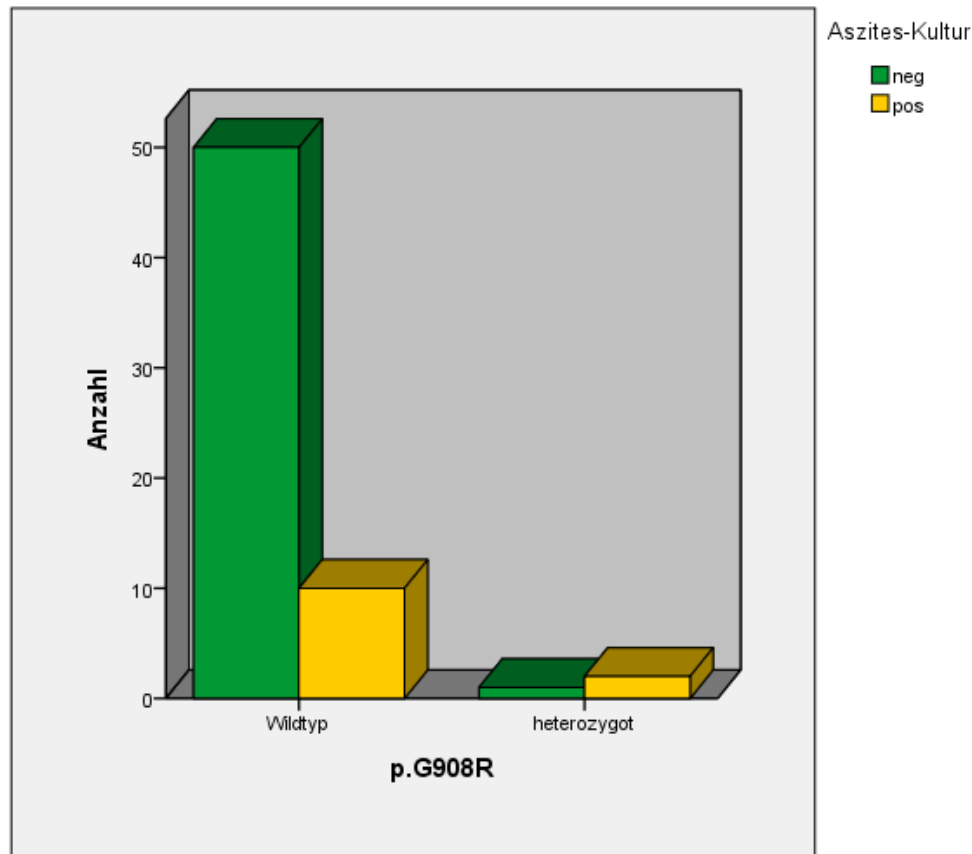


Abb. 16: Tendenziell positiver Zusammenhang zwischen der Variante p.G908R und einer positiven Asziteskultur Gruppiertes Balkendiagramm. Dargestellt ist das Überwiegen eines positiven Kulturergebnisses bei Trägern der Mutation p.G908R.

Das Vorhandensein einer der drei Mutationen korrelierte insgesamt am stärksten mit einer positiven Kultur ($p = 0,018$; Abbildung 17). Wie die Abbildung zeigt, war die Asziteskultur bei Patienten ohne Mutation deutlich häufiger negativ als bei der Patientengruppe mit Mutation.

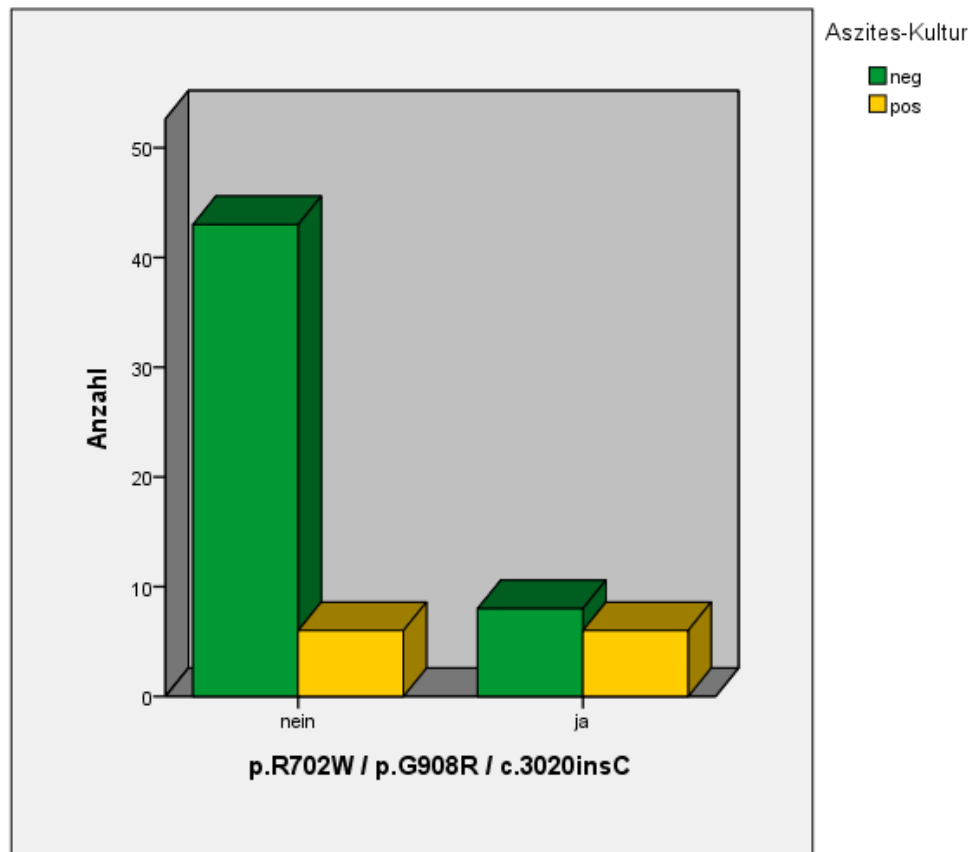


Abb. 17: Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Mutation und einer positiven Asziteskultur Gruppiertes Balkendiagramm. Die Abbildung zeigt, dass das Kulturergebnis bei Patienten mit genetischem Wildtyp deutlich häufiger negativ war als bei Trägern einer Variante.

Die obigen Ergebnisse wurden mit Hilfe weiterer Vierfelder-Tafeln überprüft. Bei Vorliegen der heterozygoten Form von p.R702W hatten die Patienten ein etwa 8,2-fach erhöhtes Risiko (Odds ratio) für eine positive Asziteskultur. Der p-Wert lag bei $\sim 0,02$. Auch für p.G908R zeigte sich hier ein Zusammenhang: Das Risiko einer positiven Asziteskultur war bei heterozygotem Genotyp etwa 10-fach erhöht. Der p-Wert lag bei $\sim 0,03$; allerdings enthielt das 95%-Konfidenzintervall den Wert 1. Zwischen c.3020insC und einer positiven Kultur ließ sich wie oben kein statistisch relevanter Zusammenhang erkennen.

Die höchste Signifikanz hatte die Assoziation zwischen dem Vorliegen einer der drei *NOD2*-Mutationen und der Kultur. Patienten mit Mutation wiesen gegenüber den Patienten mit Wildtyp ein $\sim 5,4$ -fach erhöhtes Risiko für eine positive Asziteskultur auf. Der p-Wert lag bei 0,01. Mit einem p-Wert von $\sim 0,04$ bestand auch ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Allel 1 oder Allel 2 und der Kultur (Tabelle 15).

Tabelle 15: Statistische Tests der Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer Mutation und dem Auftreten einer positiven Asziteskultur.

	Allele	Genotypen
p.R702W	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 7,143 C.I. = [1,123 – 45,428] p = 0,07474	Odds ratio = 8,167 C.I. = [1,191 – 55,996] p = 0,01508
p.G908R	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 9,182 C.I. = [0,797 – 105,802] p = 0,16304	Odds ratio = 10,000 C.I. = [0,825 – 121,172] p = 0,03137
c.3020insC	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 1,764 C.I. = [0,321 – 9,692] p = 0,78298	Odds ratio = 1,840 C.I. = [0,311 – 10,875] p = 0,49612
p.R702W / p.G908R / c.3020insC	Allel 1 ↔ Allel 2	Wildtyp ↔ heterozygote Variante
	Odds ratio = 3,917 C.I. = [1,213 – 12,651] p = 0,03958	Odds ratio = 5,375 C.I. = [1,379 – 20,945] p = 0,01010

Die aufgeführten Beobachtungen stützen die Hypothese, dass das Vorliegen einer Mutation Einfluss auf die Diagnose SBP oder zumindest auf das Auftreten einer positiven Asziteskultur hat.

5. Diskussion

Die spontane bakterielle Peritonitis (SBP) gehört zu den häufigen und gefährlichen Komplikationen einer Leberzirrhose. Sie tritt bei Patienten mit massivem Aszites auf. Der Schlüsselmechanismus in der Pathogenese dieser Komplikation ist die bakterielle Translokation [8]. Dabei kommt es zu einem Versagen der intestinalen Abwehrmechanismen bei Patienten mit Zirrhose [3, 6, 16, 40, 41]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass die drei Varianten p.R702W, p.G908R und c.3020insC im *NOD2*-Gen die Entstehung einer SBP bei Leberzirrhose begünstigen. Zwar wird derzeit zunehmend über die Rolle von *NOD2*-Mutationen in diesem Prozess diskutiert, doch gab es bisher nur eine Vorarbeit zu diesem Thema [42].

Bedeutung von *NOD2*-Varianten bei SBP und Bacterasozites

Zunächst wurde ein Kollektiv von Patienten, die eine Leberzirrhose mit konsekutiv aufgetretenem Aszites aufwiesen, rekrutiert. Der Schweregrad der Zirrhose wurde u.a. mit Hilfe des MELD- und des Child-Pugh-Scores bestimmt. Das Gesamtkollektiv umfasste drei Patientengruppen aus Homburg (n = 25), Jena (n = 27) und Regensburg (n = 105). Es handelte sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um Patienten europäischer Herkunft. Im Gesamtkollektiv entwickelten 25 Personen (16,1%) eine SBP. Von den 157 Patienten wurde bei 104 Personen eine Genotypisierung hinsichtlich der drei *NOD2*-Varianten durchgeführt. In dieser Gruppe konnte bei insgesamt 23 Individuen (22,1%) eine heterozygote Mutation festgestellt werden. 10 Patienten (9,6%) waren Träger der Mutation p.R702W, bei 5 Patienten (4,8%) wurde die Variante p.G908R nachgewiesen und 9 Patienten (8,7%) wurden positiv auf die Mutation c.3020insC getestet. Eine Patientin trug sowohl die heterozygote Form von p.G908R als auch von c.3020insC. Aus anderen Arbeiten mit Bezug zum *NOD2*-Gen geht hervor, dass die Häufigkeiten der drei *NOD2*-Varianten in kaukasischen Populationen mit Morbus Crohn (Europa und Nordamerika) von 19% bis 29% reichen [33, 34, 43-48]. Bei Amerikanern afrikanischer Abstammung werden die mutierten Allele seltener nachgewiesen [49]. Keine der drei Mutationen wurde bei asiatischen Populationen mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung gefunden [50-52]. Studien zu Morbus Crohn in Finnland [53], Irland [54, 55], Schottland [55] und Island [56] weisen auf eine etwas geringere Häufigkeit der drei *NOD2*-Varianten in diesen Bevölkerungsgruppen hin. Insgesamt unterscheidet sich die *NOD2*-Mutationsfrequenz in unserer Kohorte nicht wesentlich von der Gesamtbevölkerung.

Die Patienten mit und ohne Mutation wurden hinsichtlich der Komplikationen SBP, positive Asziteskultur, CNNA und Bacteraszites überprüft. Ihr Alter, das Geschlecht und der Schweregrad der Zirrhose wurden ebenfalls zu den *NOD2*-Varianten in Beziehung gesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Prüfung des Einflusses der Mutationen auf verschiedene Laborparameter. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte die Relevanz des *NOD2*-Gens für die Entstehung einer SBP bestätigt werden. Personen mit einer Mutation dieses Gens entwickelten signifikant häufiger eine SBP bzw. eine positive Asziteskultur als Patienten mit Wildtyp-Allelen.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe [42], in der ebenfalls der Einfluss von *NOD2*-Mutationen auf die SBP untersucht wurde. Die Studie beinhaltete ein ähnlich großes Kollektiv von 150 Patienten, wovon bei insgesamt 52 Personen eine SBP diagnostiziert wurde. Mit einem p-Wert von 0,004 konnte gezeigt werden, dass Träger einer Mutation signifikant häufiger eine SBP entwickeln. In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein solcher Zusammenhang nur für c.3020insC nachweisen ($p = 0,046$ bzw. 0,02). Zusätzlich wurde in der Vorarbeit nachgewiesen, dass die Mortalität bei Mutationsträgern erhöht war, denn das mittlere Überleben der Patienten war deutlich kürzer ($p = 0,007$). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Mutation und Mortalität nicht bestätigt werden, was am ehesten an fehlenden Daten bezüglich des Überlebens der Patienten lag (siehe Abschnitt 4.2.1). Für die geringe Datenerhebung hinsichtlich der Mortalität gab es mehrere Gründe: Zum Einen stammten die Patientenkollektive aus verschiedenen Kliniken, was das Follow-up deutlich erschwerte. Zum Anderen waren einige Patienten poststationär aufgrund fehlender Kontaktdaten nicht mehr erreichbar. Das Problem von unvollständigen Daten bestand ebenfalls für andere Parameter. Eine lückenlose Beurteilung der Zusammenhänge zwischen einzelnen Faktoren wurde dadurch erschwert. Daher sind die vorliegenden Ergebnisse mit Einschränkung zu werten und sollten in weiteren Studien überprüft werden.

Neue Erkenntnisse zur Funktion von *NOD2*

Die Mukosa des Darms besteht aus einer einlagigen Schicht Epithelzellen, die mit Hilfe so genannter tight junctions und adherens junctions abgedichtet wird. Es handelt sich hierbei um Membranproteine bzw. Adhäsionsverbindungen, die eine ungehinderte Diffusion über die Mukosa verhindern und mechanische Stabilität vermitteln. Sie bilden einen Teil der Mukosa-Barriere des Darms. Bakterielle Virulenzfaktoren greifen nachweislich direkt an den tight junctions an und erhöhen dadurch die Permeabilität der Membran bei akuten gastrointestinalen Infekten [57]. Mechanische Abwehr allein reicht jedoch nicht aus, um einen ausreichenden Schutz vor dem Eindringen von Bakterien und Viren zu vermitteln. Deshalb gehört zur Mukosa-Barriere noch eine zweite Komponente, die vom angeborenen und erworbenen Immunsystem gebildet wird. Zur angeborenen Abwehr rechnet man das vom *NOD2*-Gen

produzierte Protein, das in Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen und nach Einwirken proinflammatorischer Stimuli auch in intestinalen Epithelzellen gebildet wird [58, 59]. NOD2 ist ein intrazelluläres Protein, das proinflammatorische Signalwege reguliert, indem es den Bakterienbestandteil MDP erkennt. Mit Hilfe des Transkriptionsfaktors NF- κ B werden in der Folge verstärkt proinflammatorische Mediatoren transkribiert. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass NOD2 beim Menschen möglicherweise bei der Erkennung einer ganzen Bandbreite von Pathogenen eine Rolle spielt, u.a. bei *Listeria monocytogenes*, Pneumokokken, *Helicobacter pylori* und *Mycobacterium tuberculosis* [60-63].

In einer Studie aus dem Jahr 2010 zur Bedeutung des NOD2-Proteins konnte gezeigt werden, dass NOD2 nach Stimulation mit MDP nicht nur die Zahl entzündlicher Mediatoren erhöht, sondern auch in so genannten dendritischen Zellen einen Autophagie-Prozess einleitet [64]. Dendritische Zellen gehören zu den professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC), die wesentlich zur T-Zell-Aktivierung und damit zur spezifischen Abwehr beitragen. Autophagie bezeichnet einen intrazellulären Prozess, bei dem die Zelle eigene Bestandteile, wie z.B. intrazelluläre Bakterien oder Viren, abbaut. Die innerhalb dieses Vorgangs entstandenen Spaltprodukte werden an MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC = major histocompatibility complex) gebunden und von diesen auf der Zelloberfläche der dendritischen Zellen präsentiert. Hier können sie von spezifischen CD4⁺-T-Lymphozyten erkannt und gebunden werden. In der Studie [64] wurden dendritische Zellen gesunder Probanden solchen von Crohn-Patienten, bei denen die auch in dieser Arbeit untersuchten *NOD2*-Varianten p.R702W, p.G908R oder c.3020insC vorlagen, gegenüber gestellt [33, 34, 65]. Zusätzlich wiesen einige Patienten eine Mutation (p.T300A) in einem anderen Gen, *ATG16L1*, auf. Es codiert für das ATG16L1-Protein (autophagy-related-protein 16-1), das am Prozess der Autophagie beteiligt ist. *ATG16L1*-Polymorphismen können die Anfälligkeit für Morbus Crohn erhöhen [66, 67]. Die Proteine interagieren miteinander, indem NOD2 das ATG16L1-Protein an den Eintrittsort von Bakterien in dendritische Zellen rekrutiert und so deren Akkumulation in Autophagosomen ermöglicht [68]. Bei den gesunden Probanden ergab sich nach Stimulation der dendritischen Zellen mit dem NOD2-Protein die oben beschriebene Zunahme von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche. Bei den Crohn-Patienten mit Risikoallelen für *NOD2* oder *ATG16L1* konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. *ATG16L1*-Varianten wurden bisher bei Patienten mit Leberzirrhose nicht untersucht.

Dass die von NOD2 regulierten Signalwege nicht nur von der intakten Funktion dieses Proteins selbst, sondern auch von anderen Faktoren abhängig sind, zeigt eine andere aktuelle Arbeit [69]. Dort wurde der Einfluss des Proteins CARD8 (= caspase activating and

recruitment domain 8) auf die durch NOD2 vermittelten Signalkaskaden untersucht. CARD8 ist aus einer C-terminalen CARD- und einer N-terminalen FIIND-Domäne zusammengesetzt [70]. Die Studie konnte zeigen, dass CARD8 die Signalkette, die normalerweise nach Stimulation von NOD2 mit Muramyl-Dipeptid (MDP) abläuft, hemmt. Dies führt zu einer verminderten Produktion des proinflammatorischen Mediators NF- κ B. Diese Effekte werden auf eine Hemmung der Oligomerisation des NOD2-Proteins durch CARD8 zurückgeführt. CARD8 ist somit offenbar ein weiterer molekularer Schalter in der Regulationskette der NOD2-abhängigen Entzündungsprozesse in Epithelzellen.

Die Entdeckung dieser Zusammenhänge untermauert die Hypothese, dass das NOD2-Protein in vielfältiger Weise die Immunabwehr beeinflusst. Seit der Entdeckung der Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von *NOD2*-Varianten und Morbus Crohn 2001 [34] wurden auch Assoziationen mit anderen chronisch-entzündlichen Funktionsstörungen, wie z.B. Allergien und atopischer Dermatitis, gefunden [71-73]. So untersuchten Weidinger et al. [73] ein großes Patientenkollektiv ($n = 1857$) mit den Krankheitsbildern Asthma ($n = 167$; 9%), atopisches Ekzem ($n = 242$; 13%) und allergische Rhinokonjunktivitis ($n = 488$; 26%) auf acht Polymorphismen des *NOD2*-Gens, um mögliche Assoziationen mit dem atopischen Phänotyp zu finden. Es zeigte sich, dass zwei Mutationen signifikant mit der Erkrankung Asthma assoziiert waren; eine Variante senkte das Risiko daran zu erkranken, die andere erhöhte es ($p = 0,013$ bzw. $0,023$). Zwei Polymorphismen zeigten signifikante Assoziationen mit der allergischen Rhinokonjunktivitis; beide senkten das Risiko für dieses Krankheitsbild signifikant ($p = 0,049$ bzw. $0,025$). Für eine weitere *NOD2*-Variante, in unserer Arbeit als p.G908R bezeichnet, wurde ein gesteigertes Risiko für erhöhte IgE-Serumkonzentrationen nachgewiesen ($p = 0,006$). Auch Reijmerink et al. [72] konnten in ihrer Studie bei holländischen Kindern *NOD2* zusammen mit einigen anderen Genen als wichtigen Faktor für die Entwicklung von Atopie und Asthma identifizieren. Die Arbeitsgruppe um Kabesch [71] untersuchte ebenfalls bei 1872 Kindern die Zusammenhänge zwischen *NOD2*-Varianten und Atopie. Es wurden drei Mutationen geprüft, darunter die in unserer Arbeit als c.3020insC klassifizierte Variante. Für alle drei konnten positive Assoziationen mit allergischen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Bei Vorliegen der Mutation c.3020insC war das Risiko für Atopie um 50% gesteigert ($p < 0,05$) und die Serum-IgE-Konzentrationen waren erhöht ($p < 0,01$). Dies entspricht der von Weidinger et al. [73] für die Mutation p.G908R gemachten Beobachtung.

In Einklang mit den obigen Ergebnissen wies eine Arbeit aus dem Universitätsklinikum Regensburg [36] nach, dass das Vorliegen von *NOD2*-Varianten bei Empfängern oder Spendern von Blutstammzellen im Rahmen von Stammzelltransplantationen das Risiko für die

Entwicklung von Graft-versus-Host-Reaktionen deutlich erhöht (25% bei Trägern von Wildtyp-Allelen versus 38% bei Empfängern oder Spendern mit Mutationen, $p = 0.01$). In der Analyse der einzelnen *NOD2*-Varianten zeigte sich, dass die Mutation c.3020insC zudem eine Rolle für die Sterblichkeit der Patienten spielt (Gesamt-Überleben 49% bei Wildtyp versus 26% bei c.3020insC Spendern, $p = 0.007$). Die Ergebnisse der geschilderten Studien verdeutlichen den Stellenwert des *NOD2*-Gens bei komplexen immunologischen Erkrankungen.

Neue Möglichkeiten der SBP-Diagnostik

Die richtige und frühzeitige Diagnose einer SBP ist von entscheidender Bedeutung für die Therapie und das Überleben der Patienten. Da körperliche Symptome ein diffuses Bild bieten und gelegentlich auch fehlen können, kann sich der Arzt nicht allein auf die Klinik verlassen [5-7]. Nach einer Parazentese können in der Aszites-Flüssigkeit die Anzahl der Neutrophilen/Leukozyten sowie die Konzentrationen von Eiweiß, Albumin, Glucose und Lactatdehydrogenase bestimmt werden. Neuere Studien untersuchten zusätzlich die Bedeutung von so genannten LERS (= leukocyte esterase reagent stripes) als Schnelltest-Verfahren. Diese Teststreifen wurden ursprünglich für die Urindiagnostik entwickelt. Nach Eintauchen in die Aszites-Flüssigkeit kommt es zu einem Farbumschlag in entsprechenden Referenzbereichen, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer SBP eingrenzt werden kann [74-78]. Koulazidis et al. [78] zeigten jedoch 2008 in einer Meta-Analyse, dass die Aussagekraft der Teststreifen je nach Studie und verwendeter Marke deutlich variierte. Die Sensitivität des Test-Verfahrens reichte von 45 - 100%, die Spezifität von 81 - 100%, der positive prädiktive Wert lag bei 42 - 100% und der negative prädiktive Wert variierte zwischen 87 und 100%. Da Spezifität und negativer prädiktiver Wert in den untersuchten Studien konstant relativ hoch waren, sahen Koulazidis et al. [78] trotz der zum Teil erheblichen Schwankungen bei Sensitivität und Spezifität einen diagnostischen Stellenwert von LERS. Eine Arbeit aus dem Jahr 2007 [79] beurteilte den Nutzen der Teststreifen im Gegensatz dazu kritischer, da die Sensitivität der verwendeten Streifen sehr niedrig war. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen [80, 81]. Die falsch negativen und richtig positiven Testergebnisse der Patienten mit SBP wurden miteinander verglichen; man stellte fest, dass der mittlere Proteingehalt im Aszites der falsch negativ getesteten Patienten deutlich höher war als bei den richtig positiv Getesteten. Daraus schloss die Arbeitsgruppe [79], dass die Leukozyten-Esterase der verwendeten Streifen möglicherweise durch den hohen Proteingehalt im Aszites blockiert wird. In der Urindiagnostik, für die die LERS entwickelt wurden, ist das meistens kein Problem. Da im Urin selten Proteinkonzentrationen $> 1\text{g/l}$ vorkommen, ist eine Störung der Detektion von Leukozyten dort weniger wahrscheinlich. In Aszites-Flüssigkeit jedoch, die einen höheren Proteingehalt aufweist, kann eine – wie in den Studien festgestellt – insuffi-

zierte Sensitivität der Teststreifen resultieren. Die Verwendung der LERS bleibt somit ein strittiger Punkt und sollte das Standardverfahren zur SBP-Diagnostik vorerst nicht ersetzen. Aus den oben geschilderten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung der Teststreifen verzichtet. Stattdessen wurden, wenn möglich unmittelbar nach der Punktion, Blutkulturflaschen (aerob und anaerob) mit Aszites beimpft. Dieses Vorgehen entspricht dem aktuellen Goldstandard und steigert die Ausbeute der Aszites-Kulturen von 40% auf > 80% [16].

Fazit

Mutationen im *NOD2*-Gen können seine immunmodulatorische Funktion und damit die intestinale Mukosa-Barriere beeinträchtigen. Entzündungen wie die spontane bakterielle Peritonitis oder der Morbus Crohn werden durch bestimmte *NOD2*-Varianten, die auch die Sterblichkeit erhöhen, begünstigt. Deshalb sollten die molekularen Mechanismen von *NOD2* weiter entschlüsselt werden und zusätzliche Studien zur proinflammatorischen Wirkung von *NOD2*-Defekten bei Patienten mit Leberzirrhose durchgeführt werden. Ein Ziel ist es, Zirrhose-Patienten mit erhöhtem Risiko für entzündliche Komplikationen frühzeitig zu erkennen und bei diesen Patienten Präventionsmaßnahmen, z.B. eine präemptive Antibiotikagabe, zu veranlassen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] **Wettstein, M.**, C. Kudlek, and D. Häussinger, *Spontane bakterielle Peritonitis (Diagnose, Therapie und Prophylaxe)*. Deutsches Ärzteblatt, 2000. Jg. 97(42): p. 2789-2792.
- [2] **Reuben, A.**, *Landmarks in hepatology. Au Contraire, professeur Pasteur!* Hepatology, 2004. 40(6): p. 1478-82.
- [3] **Runyon, B.A.**, S. Squier, and M. Borzio, *Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis*. J Hepatol, 1994. 21(5): p. 792-6.
- [4] **Navasa, M.** and J. Rodes, *Bacterial infections in cirrhosis*. Liver Int, 2004. 24(4): p. 277-80.
- [5] **Andreu, M.**, et al., *Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites*. Gastroenterology, 1993. 104(4): p. 1133-8.
- [6] **Guarner, C.** and G. Soriano, *Spontaneous bacterial peritonitis*. Semin Liver Dis, 1997. 17(3): p. 203-17.
- [7] **Runyon, B.**, ed. *Ascites and spontaneous bacterial peritonitis*. 8th ed., ed. F.L. In: Feldmann M, Sleisenger MH, eds. *Sleisenger and Fordran's gastrointestinal and liver disease*. 2006, Saunders: Philadelphia. 1935-1964.
- [8] **Koulaouzidis, A.**, S. Bhat, and A.A. Saeed, *Spontaneous bacterial peritonitis*. World J Gastroenterol, 2009. 15(9): p. 1042-9.
- [9] **Deschenes, M.** and J.P. Villeneuve, *Risk factors for the development of bacterial infections in hospitalized patients with cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(8): p. 2193-7.
- [10] **Llach, J.**, et al., *Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein concentration*. Hepatology, 1992. 16(3): p. 724-7.
- [11] **Guarner, C.**, et al., *Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels*. Gastroenterology, 1999. 117(2): p. 414-9.
- [12] **McGibbon, A.**, et al., *An evidence-based manual for abdominal paracentesis*. Dig Dis Sci, 2007. 52(12): p. 3307-15.
- [13] **Wong, C.L.**, et al., *Does this patient have bacterial peritonitis or portal hypertension? How do I perform a paracentesis and analyze the results?* JAMA, 2008. 299(10): p. 1166-78.
- [14] **Pache, I.** and M. Bilodeau, *Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. 21(5): p. 525-9.

- [15] **Grabau, C.M.**, et al., *Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis*. Hepatology, 2004. 40(2): p. 484-8.
- [16] **Garcia-Tsao, G.**, et al., *Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites*. Gastroenterology, 1995. 108(6): p. 1835-41.
- [17] **Angeloni, S.**, et al., *Validation of automated blood cell counter for the determination of polymorphonuclear cell count in the ascitic fluid of cirrhotic patients with or without spontaneous bacterial peritonitis*. Am J Gastroenterol, 2003. 98(8): p. 1844-8.
- [18] **Cereto, F.**, J. Genesca, and R. Segura, *Validation of automated blood cell counters for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis*. Am J Gastroenterol, 2004. 99(7): p. 1400.
- [19] **Chen, T.A.**, et al., *Single daily amikacin versus cefotaxime in the short-course treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics*. World J Gastroenterol, 2005. 11(43): p. 6823-7.
- [20] **Rimola, A.**, et al., *Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study*. Hepatology, 1995. 21(3): p. 674-9.
- [21] **Angeloni, S.**, et al., *Efficacy of current guidelines for the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in the clinical practice*. World J Gastroenterol, 2008. 14(17): p. 2757-62.
- [22] **Wong, F.**, et al., *Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club*. Gut, 2005. 54(5): p. 718-25.
- [23] **Garcia-Tsao, G.**, *Bacterial infections in cirrhosis: treatment and prophylaxis*. Journal of Hepatology, 2005(42): p. 85-92.
- [24] **Tito, L.**, et al., *Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors*. Hepatology, 1988. 8(1): p. 27-31.
- [25] **Gines, P.**, et al., *Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial*. Hepatology, 1990. 12(4 Pt 1): p. 716-24.
- [26] **Inadomi, J.** and A. Sonnenberg, *Cost-analysis of prophylactic antibiotics in spontaneous bacterial peritonitis*. Gastroenterology, 1997. 113(4): p. 1289-94.
- [27] **Das, A.**, *A cost analysis of long term antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 1998. 93(10): p. 1895-900.
- [28] **Grange, J.D.**, et al., *Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial*. J Hepatol, 1998. 29(3): p. 430-6.
- [29] **Novella, M.**, et al., *Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin*. Hepatology, 1997. 25(3): p. 532-6.
- [30] **Rolachon, A.**, et al., *Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial*. Hepatology, 1995. 22(4 Pt 1): p. 1171-4.

- [31] **Brenmoehl, J.**, et al., *Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients*. Intensive Care Med, 2007. 33(9): p. 1541-8.
- [32] **Chamaillard, M.**, et al., *Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation*. Cell Microbiol, 2003. 5(9): p. 581-92.
- [33] **Hugot, J.P.**, et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. 411(6837): p. 599-603.
- [34] **Ogura, Y.**, et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. 411(6837): p. 603-6.
- [35] **Holler, E.**, et al., *Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2004. 104(3): p. 889-94.
- [36] **Holler, E.**, et al., *The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation*. Int J Immunogenet, 2008. 35(4-5): p. 381-4.
- [37] **Inohara, N.**, et al., *Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides*. J. Biol Chem, 2001(276): p. 2551-2554.
- [38] **Runyon, B.A.**, *Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1990. 12(4 Pt 1): p. 710-5.
- [39] **Runyon, B.A.** and J.C. Hoefs, *Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis*. Hepatology, 1984. 4(6): p. 1209-11.
- [40] **Cirera, I.**, et al., *Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis*. J Hepatol, 2001. 34(1): p. 32-7.
- [41] **Llovet, J.M.**, et al., *Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis*. Gut, 1994. 35(11): p. 1648-52.
- [42] **Appenrodt, B.**, et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis*. Hepatology, 2010. 51(4): p. 1327-33.
- [43] **Hampe, J.**, et al., *Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations*. Lancet, 2001. 357(9272): p. 1925-8.
- [44] **Vermeire, S.**, et al., *CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure*. Am J Hum Genet, 2002. 71(1): p. 74-83.
- [45] **Cuthbert, A.P.**, et al., *The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. 122(4): p. 867-74.
- [46] **Lesage, S.**, et al., *CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease*. Am J Hum Genet, 2002. 70(4): p. 845-57.
- [47] **Abreu, M.T.**, et al., *Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2002. 123(3): p. 679-88.

- [48] **Ahmad, T.**, et al., *The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease*. Gastroenterology, 2002. 122(4): p. 854-66.
- [49] **Bonen, D.K.**, et al., *Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan*. Gastroenterology, 2003. 124(1): p. 140-6.
- [50] **Yamazaki, K.**, et al., *Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease*. J Hum Genet, 2002. 47(9): p. 469-72.
- [51] **Croucher, P.J.**, et al., *Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations*. Eur J Hum Genet, 2003. 11(1): p. 6-16.
- [52] **Leong, R.W.**, et al., *NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. 17(12): p. 1465-70.
- [53] **Helio, T.**, et al., *CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease*. Gut, 2003. 52(4): p. 558-62.
- [54] **Bairead, E.**, et al., *Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population*. Eur J Hum Genet, 2003. 11(3): p. 237-44.
- [55] **Arnott, I.D.**, et al., *NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?* Genes Immun, 2004. 5(5): p. 417-25.
- [56] **Thjodleifsson, B.**, et al., *Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives?* Gastroenterology, 2003. 124(7): p. 1728-37.
- [57] **Berkes, J.**, et al., *Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation*. Gut, 2003. 52(3): p. 439-51.
- [58] **Hisamatsu, T.**, et al., *CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. 124(4): p. 993-1000.
- [59] **Rosenstiel, P.**, et al., *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. 124(4): p. 1001-9.
- [60] **Kobayashi, K.S.**, et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. 307(5710): p. 731-4.
- [61] **Opitz, B.**, et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2004. 279(35): p. 36426-32.
- [62] **Ferwerda, G.**, et al., *Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2*. J Leukoc Biol, 2007. 82(4): p. 1011-8.
- [63] **Ferwerda, G.**, et al., *NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2005. 1(3): p. 279-85.
- [64] **Cooney, R.**, et al., *NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation*. Nat Med, 2010. 16(1): p. 90-7.

- [65] *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.* Nature, 2007. 447(7145): p. 661-78.
- [66] **Hampe, J.**, et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.* Nat Genet, 2007. 39(2): p. 207-11.
- [67] **Parkes, M.**, et al., *Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility.* Nat Genet, 2007. 39(7): p. 830-2.
- [68] **Travassos, L.H.**, et al., *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.* Nat Immunol, 2010. 11(1): p. 55-62.
- [69] **von Kampen, O.**, et al., *The caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) negatively regulates NOD2-mediated signaling.* J Biol Chem, 2010.
- [70] **Bouchier-Hayes, L.**, et al., *CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways.* J Biol Chem, 2001. 276(47): p. 44069-77.
- [71] **Kabesch, M.**, et al., *Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations.* J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(4): p. 813-7.
- [72] **Reijmerink, N.E.**, et al., *TLR-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy.* Allergy, 2010. 65(2): p. 199-207.
- [73] **Weidinger, S.**, et al., *Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults.* Clin Exp Allergy, 2005. 35(7): p. 866-72.
- [74] **Vanbiervliet, G.**, et al., *Diagnostic accuracy of a rapid urine-screening test (Multistix8SG) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. 14(11): p. 1257-60.
- [75] **Castellote, J.**, et al., *Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips.* Hepatology, 2003. 37(4): p. 893-6.
- [76] **Thevenot, T.**, et al., *Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004. 16(6): p. 579-83.
- [77] **Nguyen-Khac, E.**, et al., *Review article: the utility of reagent strips in the diagnosis of infected ascites in cirrhotic patients.* Aliment Pharmacol Ther, 2008. 28(3): p. 282-8.
- [78] **Koulaouzidis, A.**, et al., *Leucocyte esterase reagent strips for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis: a systematic review.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. 20(11): p. 1055-60.
- [79] **Gulberg, V.**, et al., *Insufficient sensitivity of reagent strips for spontaneous bacterial peritonitis.* Hepatology, 2007. 46(5): p. 1669; author reply 1669-70.
- [80] **Nousbaum, J.B.**, et al., *Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis.* Hepatology, 2007. 45(5): p. 1275-81.

- [81] **Campillo, B.**, J.P. Richardet, and C. Dupeyron, *Diagnostic value of two reagent strips (Multistix 8 SG and Combur 2 LN) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and symptomatic bacterascites*. Gastroenterol Clin Biol, 2006. 30(3): p. 446-52.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes. Ohne das Engagement, die Unterstützung und die Bemühungen etlicher Personen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank hierbei gilt:

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Frank Lammert,

Direktor der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit in seiner Klinik und die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung in allen Fragen des wissenschaftlichen Arbeitens sowie für die kritische Durchsicht dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. med. Frank Grünhage,

Oberarzt in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Unterstützung in statistischen Fragen und die Co-Korrektur dieser Arbeit.

Frau Miriam Mahler,

zuständig für genetische Diagnostik im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, für ihre kompetente Hilfestellung bei allen labortechnischen Angelegenheiten und die Einarbeitung in den methodischen Teil der vorliegenden Dissertation.

Frau Dr. Dipl.-Math. Ong,

akademische Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die exzellente Beratung in allen statistischen Fragen.

Herrn Alexander Olbricht,

EDV-Beauftragter der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die freundliche und kompetente Hilfe bei EDV-Angelegenheiten.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, die mich beim Sammeln der Patienten-Proben unterstützt haben, sowie den Kliniken für Innere Medizin I bzw. II der Universitäten Jena und Regensburg, für die großzügige Bereitstellung der Daten ihrer Patientenkollektive.

Abschließend ein Dank an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt und ermutigt haben.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Sophie Charlotte Heyer
Geburtsdatum: 15.07.1986
Geburtsort: Idar-Oberstein
Eltern: Jürgen und Rosemarie Heyer
Familienstand: Ledig

STUDIUM

10/2005 - 12/2011 Universität des Saarlandes, Universitätsklinikum Homburg
Studium der Humanmedizin

Herbst 2011 2. Ärztliche Prüfung

08/2010 - 06/2011 Praktisches Jahr am Klinikum Saarbrücken

Sommer 2007 1. Ärztliche Prüfung

SCHULE UND AUSBILDUNG

08/1996 - 03/2005 Göttenbach-Gymnasium, Idar-Oberstein
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife